

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg und Gießen

**Expression HIF-1-abhängiger Gene in humanen  
Lungenadenokarzinom (A549)-Zellen und deren Regulation nach  
Photonen- und Schwerionenbestrahlung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Verena Maria Bill aus Hadamar  
Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
26.11.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. R. Engenhardt-Cabillic

1. Korreferent: Prof. Dr. G. Suske

***Vorwort***

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde im Zeitraum vom Januar 2010 bis Januar 2012 an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Direktorin: Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic) der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen durchgeführt.

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. vet. F. Subtil angefertigt und durch Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic und Frau Dr. med. vet. F. Subtil betreut.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) durch die DFG gefördert und unterstützt.

Die vorliegende Arbeit ist dem Gebiet der Onkologie der Lunge und der Strahlentherapie zuzuordnen.

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Überblick</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Biologische und physikalische Grundlagen der Strahlenwirkung</b>	<b>2</b>
1.2.1 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	2
1.2.2 Gegenüberstellung Photonen- und Schwerionenstrahlung	4
<b>1.3 Hypoxie, Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 und Strahlenresistenz</b>	<b>6</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>10</b>
2.1.1 Geräte	10
2.1.2 Hilfs- und Verbrauchsmaterial	11
2.1.3 Verwendete PC-Programme	12
2.1.4 Verwendete Lösungen und Substanzen	13
2.1.5 Pufferzusammensetzungen	15
2.1.6 Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel	16
<b>2.2 Versuchsaufbau</b>	<b>16</b>
2.2.1 Versuchsgruppen	16
2.2.2 Zeitlicher Ablauf	18
<b>2.3 Bestrahlung</b>	<b>18</b>
2.3.1 Photonenbestrahlung	18
2.3.2 Schwerionenbestrahlung	19
<b>2.4 Zellkultur</b>	<b>19</b>
2.4.1 Zelllinie und Kultivierung	19
2.4.2 Langzeitkultivierung der Zellen	20

<b>2.5</b>	<b>Zellzählung</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Koloniebildungstest nach Puck und Marcus (1956)</b>	<b>20</b>
2.6.1	Durchführung	21
2.6.2	Auswertung	21
<b>2.7</b>	<b>RNA-Isolation</b>	<b>22</b>
<b>2.8</b>	<b>RNA-Messung</b>	<b>22</b>
<b>2.9</b>	<b>RNA Qualitätscheck mittels Agarose-Gel</b>	<b>23</b>
<b>2.10</b>	<b>cDNA Herstellung</b>	<b>24</b>
<b>2.11</b>	<b>Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion</b>	<b>24</b>
2.11.1	Primerdesign	25
2.11.2	Durchführung	27
2.11.3	Auswertung	28
<b>2.12</b>	<b>Proteinextraktion</b>	<b>29</b>
<b>2.13</b>	<b>Western Blot</b>	<b>30</b>
2.13.1	Proteinmessung	30
2.13.2	Diskontinuierliche SDS-Page-Gelelektrophorese	30
2.13.3	Durchführung und Auswertung	31
<b>2.14</b>	<b>ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für VEGF und SCF</b>	<b>32</b>
<b>2.15</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Gesteigerte Expression HIF-1-abhängiger Zielgene durch die gewählte Hypoxie- und Reoxygenierungsmethode</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Erhöhtes zelluläres Überleben hypoxischer Zellen nach Photonenbestrahlung im Gegensatz zur Schwerionenbestrahlung</b>	<b>38</b>
<b>3.3</b>	<b>Regulation der mRNA-Expression nach Photonen- gegenüber Schwerionenbestrahlung</b>	<b>40</b>
3.3.1	Expressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Photonenbestrahlung	41
3.3.2	Expressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene nach Schwerionenbestrahlung	44

<b>3.4</b>	<b>Induktion HIF-1-abhängiger-Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung in bestrahlten A549-Zellen (Sauerstoffeffekt)</b>	<b>48</b>
3.4.1	Genexpressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung in Photonen-bestrahlten A549-Zellen	48
3.4.2	Expressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung in Schwerionen-bestrahlten A549-Zellen	52
<b>3.5</b>	<b>Synergistische Wirkung von Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Bestrahlung auf HIF-1-abhängige Zielgenexpression</b>	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Regulation HIF-1<math>\alpha</math> und Zielgenen GLUT-1 und VEGF auf Proteinebene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Bestrahlung</b>	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
4.1	Gewählte Methode zur Induktion von Hypoxie und Reoxygenierung führt zu einer gesteigerten Expression HIF-1-abhängiger Zielgene	68
4.2	Erhöhtes zelluläres Überleben hypoxischer Zellen nach Photonenbestrahlung im Gegensatz zur Schwerionenbestrahlung	72
4.3	Induktion HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung ist in bestrahlten und nicht-bestrahlten A549-Zellen vergleichbar	73
4.4	Einfluss von Schwerionen- bzw. Photonenbestrahlung auf die Genregulation	75
4.4.1	Expressionssteigerung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Photonenbestrahlung	76
4.4.2	Schwerionenbestrahlung führt zu keiner Änderung der HIF-1-abhängigen Zielgenexpression	82
4.5	Synergistische Wirkung von Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Bestrahlung auf HIF-1-abhängige Zielgenexpression	84
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>90</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	90
7.2	Abbildungsverzeichnis	94

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>7.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7.4</b>	<b>Formelverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7.5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>7.6</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENSLAUF</b>	<b>113</b>
<b>9.</b>	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b>	<b>114</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>116</b>
<b>11.</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b>	

# 1. Einleitung

## 1.1 Überblick

Das Bronchialkarzinom ist mit einem Anteil von 25 Prozent das häufigste aller Karzinome weltweit (Siegel, Ward, & Brawley, 2011) (Inzidenz 52/100.000 Personen/Jahr) und hat bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 15% eine äußerst schlechte Prognose. Bei Männern ist das Bronchialkarzinom die häufigste Todesursache unter allen Tumorerkrankungen (Campbell, Freeman, & Freeman, 2007). Stadienabhängig kommen als Therapieoptionen operative Maßnahmen sowie Chemo- und Strahlentherapie zum Einsatz (Anderson & Curran, 2010). Allerdings erschweren eine frühzeitige Metastasierung und eine rasche Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika und Bestrahlung die Therapieergebnisse (Brown & Wilson, 2004). Bei den aus internistischen Gründen nicht operablen frühen Stadien, wie den lokal fortgeschrittenen Stadien stellt die Strahlentherapie die wesentliche lokale Therapiemaßnahme dar. Insgesamt werden ca. 50% aller Krebspatienten mit ionisierenden Strahlen behandelt (Seegenschmiedt & Zehe, 2012). Bereits in den 50er Jahren konnte gezeigt werden, dass vor allem Zellen in hypoxischen Tumorearealen unsensibel für Photonenbestrahlung sind (Gray, Conger, Ebert, Hornsey, & Scott, 1953). Eine bedeutende Rolle für die Therapieresistenz gegenüber Photonenbestrahlung scheint der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) zu spielen (Harada & Hiraoka, 2010; X. Zhang et al., 2004). Dabei sind die Mechanismen, die zur Radioresistenz führen, noch nicht komplett verstanden.

Schwerionenbestrahlung als neuere Behandlungsform hat eine höhere relative biologische Wirksamkeit wodurch theoretisch bei einigen Tumorentitäten die Resistenz überwunden werden könnte (RBW) (Blakely & Kronenberg, 1998; Curtis, Tenforde, & Afzal, 1984; Tobias et al., 1982). Für das Plattenepithel-Karzinom der Zervix konnten Nakano et al. in einer klinischen Studie zeigen, dass sich die lokale Rezidivrate und Remissionsdauer nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen nicht unterschieden (Nakano et al., 2006). Für die Schwerionenbestrahlung ist der Einfluss von HIF-1 noch nicht untersucht.

Das Ziel meiner Arbeit war, die Rolle, die HIF-1 bei der Radioresistenz gegenüber Photonenbestrahlung spielt, besser zu verstehen und zu klären, inwieweit HIF-1 auch die Strahlensensibilität gegenüber Schwerionenbestrahlung beeinflusst.



## ***1.2 Biologische und physikalische Grundlagen der Strahlenwirkung***

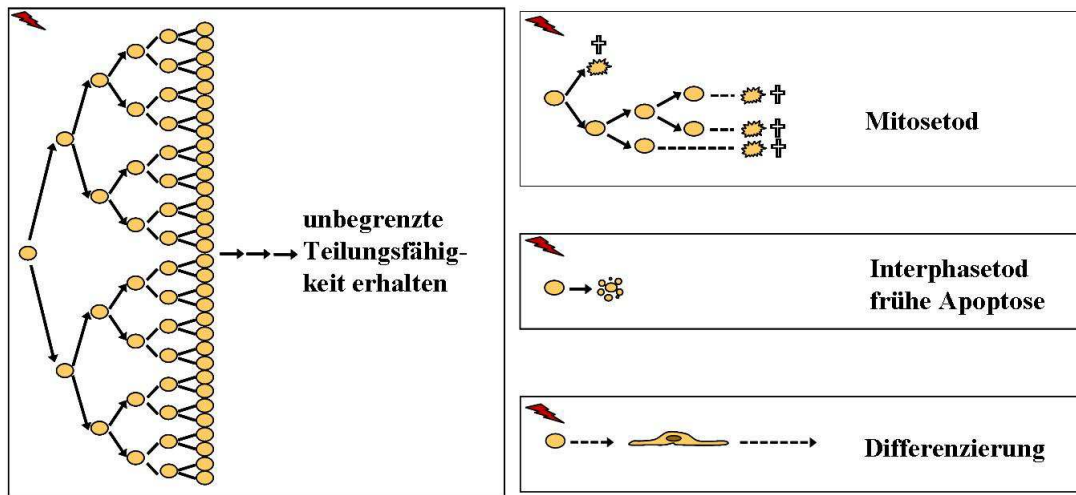
Ionisierende Strahlung ist eine energiereiche Strahlung, die beim Auftreffen auf Materie Energie abgibt und somit Atome oder Moleküle der Materie anregt und ionisiert. Wird ein Atom oder Molekül angeregt, geht ein Elektron in ein höheres Energieniveau über, wird es ionisiert, wird ein Elektron aus dem Atom oder dem Molekül entfernt (Hall & Giaccia, 2011). Die Einteilung ionisierender Strahlung erfolgt in Photonenstrahlung und Teilchenstrahlung. Zur Photonenstrahlung werden Röntgen- und Gamma-Strahlung gezählt, zur Teilchenstrahlung Neutronen, Elektronen, Protonen und Schwerionen (Hall & Giaccia, 2011). Die durch ionisierende Strahlung verursachte Energie, die eine durchdrungene Masse absorbiert, wird als Energiedosis bezeichnet und in der Einheit Gray (Gy) angegeben (wobei  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ).

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Photonen- und Schwerionenbestrahlung verglichen, sodass im Folgenden auf diese beiden Strahlenarten genauer eingegangen werden soll.

### **1.2.1 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung**

Auf menschliches Gewebe wirkt ionisierende Strahlung grundsätzlich über zwei Mechanismen: Sie kann die DNA direkt oder indirekt schädigen. „Direkt“ bedeutet, dass die Energieabsorption im gleichen Molekül stattfindet wie die Wirkung der Strahlung und somit die DNA schädigt. Bei der indirekten Wirkung werden im ersten Schritt Radikale gebildet, die erst im zweiten Schritt die DNA schädigen (Hall & Giaccia, 2011). Eine große Rolle hierbei spielt die Radiolyse von Wasser, wodurch Ionen, Radikale und Peroxide entstehen (Glocker & Risse, 1928; Roots & Okada, 1975; Schüßler, 1973). Dies ist insbesondere bei der Wirkung ionisierender Strahlung auf Gewebe von großer Bedeutung, da eine Zelle zu ca. 80% aus Wasser besteht. Die Bildung von Peroxiden wird durch die Anwesenheit von Sauerstoff begünstigt. Somit ist die indirekte Wirkung ionisierender Strahlung unter Sauerstoff erhöht (Gray et al., 1953). In diesem Zusammenhang wird von einem Sauerstoffverstärkungsfaktor (engl. Oxygen Enhancement Ratio, OER) gesprochen. Bei der Schädigung der DNA unterscheidet man DNA-Basenschäden (Loeb & Preston, 1986), DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen (Sutherland, Bennett, Sidorkina, & Laval, 2000). Die Zelle kann diese Schäden zum Teil reparieren, gelingt dies nicht, unterliegt sie dem Zelltod (Olive, 1998).

Strahlenbiologisch tritt der Zelltod mit Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit ein (Herrmann, Baumann, & Dörr, 2006a). Dabei werden 3 Arten des Zelltodes unterschieden: Beim Mitosetod kann sich die Zelle anfangs noch teilen, verliert diese Fähigkeit aber nach einigen Teilungen. Zellen, die in den Interphasetod eintreten, werden unmittelbar apoptotisch. Auch die Differenzierung zu terminalen Funktionszellen stellt eine Form des Zelltodes dar (Abb. 1).



**Abbildung 1: Arten des strahlenbiologischen Zelltodes**

Modifiziert nach Herrmann Th., Baumann M., Dörr W. (2006), Klinische Strahlenbiologie, 4. Auflage, Elsevier Urban & Fischer München

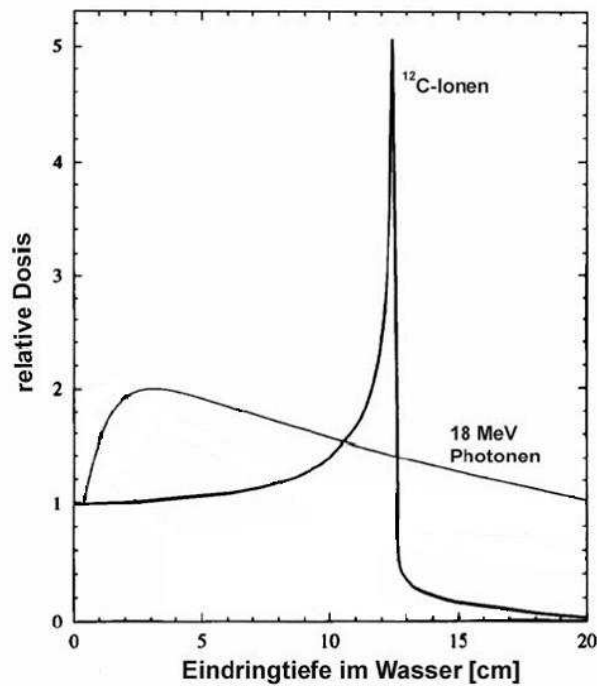
Wie hoch der Anteil der sterbenden Zellen ist, hängt von der Zellart, der Sauerstoffversorgung der Zellen, der Zellzyklusphase sowie der applizierten Dosis und dem Linearen Energietransfer (LET) der Strahlung ab. Durch das linear-quadratische Modell können diese Zusammenhänge näher beschrieben werden (Fowler, 1989; Herrmann, Baumann, & Dörr, 2006b; Rossi & Kellerer, 1972). Dabei wird der dekadische Logarithmus des zellulären Überlebens gegen verschiedene Bestrahlungsdosen aufgetragen. Die lineare Komponente dieses Modells ( $-\alpha D$ ) entsteht durch direkte Schädigung der DNA durch ein einziges Teilchen. Der Anteil direkter Schäden - und somit auch der Fraktion sterbender Zellen - steigt linear mit der applizierten Dosis an (Fowler, 1989). Die quadratische Komponente ( $-\beta D^2$ ) hingegen entsteht durch das Zusammenwirken von Schäden, die unabhängig voneinander durch zwei Teilchen verursacht wurden und, von denen jeder einzelne Schaden nicht zum Zelltod geführt hätte. Da die Wahrscheinlichkeit des Auftretens jedes einzelnen

Schadens linear mit der Dosis ansteigt, verhält sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich beide Schäden ereignen (und mit ihnen der Zelltod) proportional zum Quadrat der Dosis.

Zellen, die sich in der Mitose und in der G2-Phase befinden, sind aufgrund einer vermehrten Chromatin-Kondensation besonders empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung (Freyschmidt & Schmidt, 2001; Sinclair, 1968; Terzoudi & Pantelias, 1997). Eine wichtige Kontrollfunktion im Zellzyklus nimmt der Cyclin-abhängige-Kinasen-Inhibitor-1A (engl. cyclin dependent kinase inhibitor 1, CDKN1A, p21) ein (Cazzalini, Scovassi, Savio, Stivala, & Prosperi, 2010; Harper, Adami, Wei, Keyomarsi, & Elledge, 1993). In einer durch Strahlung geschädigten Zelle inhibiert CDKN1A die Zellzyklusprogression und verhindert somit die Vervielfältigung einer defekten DNA (Fei & El-Deiry, 2003). CDKN1A eignet sich daher sehr gut, einen erfolgten Bestrahlungseffekt auf Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu kontrollieren.

### **1.2.2 Gegenüberstellung Photonen- und Schwerionenstrahlung**

Die Bezeichnung „Schwerionen“ bezieht sich auf die im Vergleich zu Protonen größeren Masse. Diese größere Masse ist auch Ursache für wichtige physikalische Unterschiede beider Strahlenarten. Schwerionen geben nach Eindringen in das Gewebe bis zu einem definierten Punkt nur relativ wenig Energie ab. Ab diesem Punkt kommt es zu einer starken Energieabgabe, dessen Maximum als „Bragg-Peak“ bezeichnet wird (Abb. 2). Erklären lässt sich dieses Phänomen darüber, dass ein Teilchen umso mehr in Wechselwirkung mit dem zu durchdringenden Gewebe treten kann, je langsamer es wird. Dieses inverse Tiefendosisprofil (Kraft, 2000) steht dem der Photonenstrahlung gegenüber: Hier nimmt die Energiedosis nach nur kurzem Anstieg exponentiell mit der Eindringtiefe ab (Kraft, 1990) (Abb. 2). Nur durch die Verwendung der Vielfeldertechnik kann daher vermieden werden, dass vor dem Tumor liegendes gesundes Gewebe einer höheren Strahlendosis ausgesetzt wird als das Tumorgewebe selbst. Schwerionenstrahlung, die ihr Dosismaximum energieabhängig deponiert, schont gesundes Gewebe und entfaltet ihre volle Wirkung in wählbarer Gewebstiefe (Wilson, 1946).



**Abbildung 2: Tiefendosisprofil von Photonen und Schwerionenstrahlung**

[Modifiziert nach Kraft 1998]

Auch in der Art Ionisationsprozesse auszulösen, unterscheiden sich die beiden Strahlenarten. Unterschieden werden locker ionisierende und dicht ionisierende Strahlung je nach Häufigkeit der Ereignisse. Ein indirektes Maß für die Zahl der Ionisationsereignisse ist der Lineare Energietransfer (LET) (Zirkle & Tobias, 1953). Er beschreibt die Energie, die ein Teilchen pro zurückgelegten Weg an das durchdrungene Gewebe abgibt (Formel 1):

$$\text{LET} = \frac{\Delta E}{\Delta s} \quad \left[ \frac{\mu\text{m}}{\text{keV}} \right] \quad \begin{array}{l} \Delta E = \text{mittlerer Energieverlust} \\ \Delta s = \text{zurückgelegte Wegstrecke} \end{array}$$

**Formel 1: Linearer Energietransfer**

Ein LET von 3,5 keV/μm gilt als Grenze zwischen locker und dicht ionisierender Strahlung. Locker ionisierende Strahlung, zu der die Photonenstrahlung zählt, hat somit einen niedrigen LET und gibt die Energie gleichmäßig und großräumig verteilt an das durchdrungene Gewebe ab. Dies äußert sich in vereinzelten Schäden der DNA. Schwerionenstrahlung hingegen zeigt eine geringe Seitenstreuung, sodass die Strahlung an der DNA gebündelt wirken und somit einen größeren, oft irreparablen Schaden anrichten kann (Hada & Georgakilas, 2008; Hamada, 2009; Roots & Smith, 1974). So

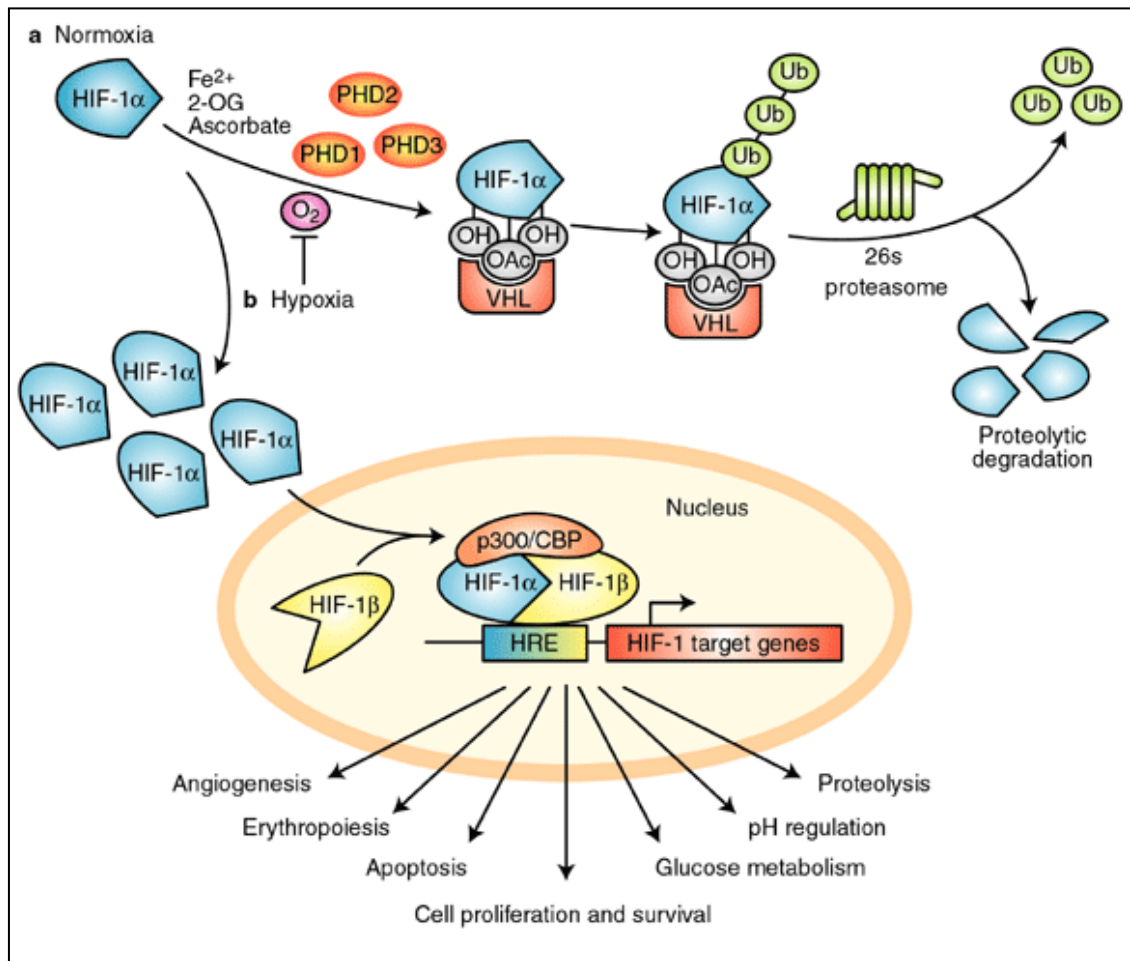
wirkt bei gleicher Energiedosis dicht ionisierende Strahlung effektiver auf Tumorzellen (Blakely & Kronenberg, 1998; M. R. Raju, 1980). Ausgedrückt wird dies mit der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW). Sie ist definiert, als das Verhältnis aus den Energiedosen zweier Strahlenarten, die die gleichen biologischen Wirkungen erzielen. Die RBW von Kohlenstoffionenbestrahlung gegenüber Photonenbestrahlung bei einem 10%igen Überleben ( $D_{10}$ ) beträgt für die untersuchte Zelllinie A549 etwa 3 (Kamlah et al., 2011).

### ***1.3 Hypoxie, Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 und Strahlenresistenz***

Gray und Thomlinson beschrieben 1953 erstmals den Zusammenhang zwischen Sauerstoff und Strahlensensibilität von Tumorgewebe. Hypoxie stellte sich als Ursache für Strahlenresistenz gegenüber Photonenbestrahlung dar (Gray et al., 1953; Thomlinson & Gray, 1955). Erklärt wird dieses Phänomen dadurch, dass locker ionisierende Strahlung die DNA der Tumorzellen hauptsächlich indirekt (ca. 2/3) schädigt. Dieser indirekte Effekt beruht auf Bildung freier Radikale, die nur unter Anwesenheit von Sauerstoff entstehen können. Für den Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER) ergab sich ein Wert von 2.8, was bedeutet, dass Zellen unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zu Zellen unter anoxischen Bedingungen fast 3-fach stärker durch locker ionisierende Strahlung geschädigt werden (Evans, Jenkins, Shapiro, & Koch, 1997; Teicher, 1995). Demgegenüber können bei dicht ionisierender Strahlung Peroxide unabhängig vom Sauerstoffgehalt entstehen, sodass der OER hier deutlich geringer ist (K. Ando et al., 1999; M R Raju et al., 1978). Ab einem LET von 300 keV/ $\mu\text{m}$  lässt sich nahezu kein OER mehr feststellen (Furusawa et al., 2000).

Ein wichtiger Adaptationsmechanismus der Zelle auch unter hypoxischen Bedingungen zu überleben, ist die Regulation des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1). HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) (G. Wang, Jiang, & Rue, 1995), von denen die  $\alpha$ -Untereinheit den Angriffspunkt für die sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 darstellt und die  $\beta$ -Untereinheit konstitutiv exprimiert wird (G. L. Semenza, 2002). Unter Anwesenheit von Sauerstoff kann HIF-1 $\alpha$  an Prolinresten hydroxyliert, vom VonHippelLindau-Protein gebunden, ubiquitiniert und somit im Proteasom abgebaut werden (Jaakkola et al., 2001) (Abb. 3). Fehlt allerdings Sauerstoff können die Prolinhydroxylasen nicht arbeiten und die  $\alpha$ -Untereinheit wird nicht abgebaut, sondern akkumuliert. Erst wenn sie in den Kern

transloziert ist, dimerisiert die  $\alpha$ - dort mit der  $\beta$ -Untereinheit und bindet an die Promoterregion (engl. hypoxia responsive element, HRE) des entsprechenden Zielgens (Bárdos & Ashcroft, 2005; G L Semenza, 2001). Darüber reguliert HIF-1 über 100 Zielgene mit HRE und übt somit Einfluss auf Metabolismus, Angiogenese, Apoptose und Proliferation aus (G. L. Semenza, 2003)(Abb. 3). Dabei stehen sich protektive und zerstörende Effekte der Zelle gegenüber (Moeller et al., 2005). Die Degradation von HIF-1 $\alpha$  wird neben Hypoxie auch über reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) (Chandel et al., 2000) und reaktive Stickstoffspezies (engl. reactive nitrogen species, RNI) verhindert (Brüne & Zhou, 2003; F. Li et al., 2007; G. L. Semenza, 2002).



**Abbildung 3: Regulation von HIF-1**

Nach Veronica A. Carroll und Margaret Ashcroft, Cambridge University Press (2005, 7)

Ein weiterer Angriffspunkt für die Regulation von HIF-1 befindet sich auf Translationsebene (Bernardi et al., 2006; Zhou & Brüne, 2006). Neben

Wachstumsfaktoren und Zytokinen soll Thioredoxin-1 (Trx-1) eine vermehrte Aktivität von HIF-1 verursachen (Ema, Hirota, Mimura, Abe, & Yodoi, 1999; Welsh, Bellamy, Briehl, & Powis, 2002). Besser bekannt ist Trx-1 als Oxidoreduktase (Holmgren, 1989; Nordberg & Arnér, 2001), die Einfluss auf Apoptose nimmt (Saitoh et al., 1998) und die Zelle vor oxidativem Stress schützt (Nakamura, Masutani, Tagaya, Yamauchi, & Inamoto, 1992).

Für den Metabolismus wichtige HIF-1-abhängige Zielgene sind der Glukose-1-Transporter (GLUT-1), die Lactatdehydrogenase-A (LDHA) und die Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1). Tumorzellen nutzen unabhängig des umgebenden Sauerstoffpartialdruckes hauptsächlich aus der Glykolyse gewonnene Milchsäure als Energielieferant (Sonveaux & Schroeder, 2008). Zellen aus gesundem Gewebe nutzen diesen Weg der Energiegewinnung jedoch nur unter hypoxischen Bedingungen. In beiden Fällen wird Adenosintriphosphat (ATP) aus Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) gewonnen. GLUT-1 sorgt dafür, dass den Zellen genug Glukose für die Glykolyse zur Verfügung steht. Die Umwandlung des Glykolyseendproduktes Pyruvat zu Laktat erfolgt durch die im Zytoplasma lokalisierte Lactatdehydrogenase (Koukourakis, Giatromanolaki, Sivridis, Gatter, & Harris, 2005). Damit Pyruvat nicht in den Zitratzyklus eintritt, wird außerdem seine Decarboxylierung zu Acetyl-Coenzym A durch PDK-1 gehemmt (Sugden & Holness, 2003).

Weiterhin ist die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) für das Tumorstadium essentiell. Neben der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ermöglicht die Angiogenese dem Tumor die Ausbreitung im Organismus (Metastasierung) (Fidler, 2003; Folkman, 1971). Der Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) als weiteres Zielgen von HIF-1 (Levy, Levy, Wegner, & Goldberg, 1995; G. L. Semenza, 2002) bindet an einen Tyrosinkinaserzeptor und vermittelt so die Angiogenese (Arbab, 2012; Shweiki, Itin, Soffer, & Keshet, 1992). VEGF-A stellt dabei den stärksten Stimulator unter den VEGF-Isoformen in Tumorzellen dar (S. Takahashi, 2011). Der Stammzellfaktor (SCF) ist neben VEGF ein weiterer wichtiger Angiogenesefaktor (Sun et al., 2006; W. Zhang, Stoica, Tasca, Kelly, & Meiningner, 2000). Über seinen Rezeptor c-Kit übt SCF außerdem Einfluss auf c-Kit tragende Endothelzellen, sowie Proliferation und Differenzierung von Stammzellen aus (Zsebo et al., 1990). Alle genannten Zielgene helfen also der (Tumor-)Zelle auch unter hypoxischen Bedingungen zu überleben. HIF-1 übt so eine zentrale Rolle auf die unter Hypoxie beobachteten Radioresistenz aus (Harada & Hiraoka, 2010; Moeller et al., 2005; Moeller, Cao, Li, & Dewhirst, 2004).

Studien belegen zudem eine schlechte Prognose bei Tumoren mit hoher HIF-1-Aktivität und Angiogeneserate (Bos et al., 2003; Lau et al., 2007; Zetter, 1998; Zhong et al., 1999).

Moeller beschrieb 2004, dass durch die Photonenbestrahlung selbst der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) *in vivo* vermehrt exprimiert werde (Moeller et al., 2004). Beobachtet wurde, dass ein steigender Sauerstoffgehalt schon vor dem Auftreten von HIF-1 auftrat und, dass dieser erstaunlicher Weise nicht zu einer verringerten HIF-1-Aktivierung führte. Dewhirst et al. sehen die Begründung dieses Phänomens, in einer durch die Bestrahlung verursachten Reoxygenierung des Tumorgewebes und dem Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die dann zu einer Aktivierung von HIF-1 führe. Somit verursache die Photonenbestrahlung *in vivo* eine vermehrte Aktivität von HIF-1. Das HIF-1-abhängige Zielgen VEGF wurde ebenfalls *in vivo* durch Photonenbestrahlung vermehrt exprimiert. Hohe HIF-1 Level verursachen eine gesteigerte Angiogenese, die wiederum mit einer verstärkten Resistenz einhergeht (Dewhirst, Cao, Li, & Moeller, 2007; Grimm et al., 2007). Über das hinaus schützt HIF-1 über verstärkte VEGF-Expression Tumorblutgefäße vor Bestrahlung (Gorski et al., 1999). Untersuchungen konnten zeigen, dass SCF als weiterer Angiogenesefaktor durch Photonenbestrahlung, nicht aber durch Kohlenstoffionenbestrahlung vermehrt exprimiert wird (Kamlah et al., 2011). Auch ein Zusammenhang zwischen SCF, HIF-1 und VEGF wird beschrieben. Litz und Krystal vermuten, dass SCF als eigentlicher Initiator über eine HIF-1-Aktivierung zu einer gesteigerten VEGF-Expression in kleinzelligen Bronchialkarzinomen führen könne (Litz & Krystal, 2006).

Somit stehen zwei Ursachen für die unter Hypoxie beobachtete Resistenz gegenüber Photonenbestrahlung im Vordergrund: Einerseits die unter Abwesenheit von Sauerstoff geringere Schädigung der DNA (Roots & Smith, 1974) und andererseits von der Tumorzelle durch Hypoxie initiierte Signalwege, die das zelluläre Überleben erhöhen (Harada, 2011). Die genauen molekularbiologischen Zusammenhänge sind im Gegensatz zu den physikalischen Ursachen jedoch noch unklar. Mit HIF-1 als Angriffspunkt wächst die Möglichkeit, die Therapie von Tumoren und damit die Prognose von betroffenen Patienten deutlich zu verbessern. Dazu muss die genaue Funktionsweise von HIF-1 sowohl unter Photonen- als unter Schwerionenbestrahlung noch besser verstanden werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
ABI Prism Real Time PCR System	HT 7900	Applied Biosystems, Foster City, US
Absaugpumpe	VacuSafe comfort	IBS Integra Bioscience, Chur, CH
Absorptions Reader	ELX 808	BioTEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
Autoklav	Model UFE 600	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, D
Brutschrank, Zellkultur	HeraCell	Heraeus GmbH, Hanau, D
Chemi luminescence Imager	ChemiGenius Bio imaging system	VWR-International, Darmstadt, D
Eismaschine	AT910	Scotsman, London, GB
Entwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa, Greenville, US
Gefrierschrank -20 °C	KGN 34A10	Bosch, Stuttgart, D
Gefrierschrank -80 °C	HERAfreeze Top	Thermo-Scientific, Schwerte, D
Heizrührer	MR 3002	Heidolph, Schwabach, D
Horizontalschüttler	KS260	IKA, Staufen, D
Hypoxieinkubator	Innova CO 48	Newbrunswick Scientific, Hamburg, D
Kühlschrank +4 °C	IKP 1700	Liebherr, Ochsenhausen, D
Kühlzentrifuge	5415R	Eppendorf, Hamburg, D
Kryobehälter	Arpege 110	VWR-International, Darmstadt, D
Kryo-Einfriergerät	„Mr. Frosty“	Roth, Karlsruhe, D
Linearbeschleuniger	Elekta Synergy	Elekta, Crawley, UK
Magnetrührer mit Heizplatte	MR3001	Heidolph, Schwabach, D
Mikroskop	DM IL LED	Leica, Wetzlar, D
Mikrowelle	R 210 A	Sharp, Hamburg, D
Millipore Filter Anlage	Millipore Mill-Q	Merck Millipore, Darmstadt, D

Gerät	Modell	Hersteller
Nano Drop®, Spectrophotometer	ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
pH-Elektrode	N 61	Schott, Mainz, D
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin, D
Präzisionswaage	LE244S90CE	Sartorius, Göttingen, D
Proteinmessung	Elx 808	BioTek, Winooski, US
Rollschüttler	SRT1	Stuart Scientific Ltd., Bath, GB
Schüttler	MS 1, Minishaker	IKA-Werke, Staufen, D
Sterilbank	Cell Gard Nu-480	Nuaire, Plymouth, US
Taummelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
Thermocycler	PCR System 2400	Gene Amp, Foster City, CA, US
Thermomixer	HTM 130 LP	MS-L GmbH, Dielheim, D
Tischzentrifuge	Galaxy Mini	VWR-International, Darmstadt, D
Vortexer	Agitateur Top-Mix 11118	Bioblock Scientific, Schwerte, D
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Water Purification	Millipore, Eschborn, D
Wasserbad	SE-Z	Julabo, Seelbach, D
Zentrifuge RNA	Mikro 200 R	Hettich, Kirchlingern, D
Zentrifuge Zellkultur	Universal 2S	Hettich, Kirchlingern, D

Tabelle 1: Geräte

### 2.1.2 Hilfs- und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Abgene PCR Plates	Thermo Scientific, Schwerte, D
Alu Rack	Roth, Karlsruhe, D
Chemiluminescence Film ECL	Amersham, Little Chalfont, UK
Cronex 5, Röntgenfilm	AGFA, Mortsel, B
Deckel für Reaktionsgefäße, Stripes	Nerbe Plus GmbH, Winsen, D
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, D
Eiswannen	Roth, Karlsruhe, D
Elektrische Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences, Chur, CH

Bezeichnung	Hersteller
Falcons 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, US
Gel Blot Paper	Whatman Ltd., Kent, UK
Gel Ständer	Bio Rad, München, D
Gelkamm	Biometra GmbH, Göttingen, D
Handschuhe, Microtouch Nitra-Tex, S	Ansell Healthcare Europe, Brüssel, B
Hypercasette <sup>TM</sup>	Amersham, Buckinghamshire, GB
Hyper <sup>TM</sup> , ECL-Filme	Amersham, Freiburg, D
Klebecoverfolie ABsolute qPCR Seal	Thermo Scientific, Schwerte, D
Kryoröhrchen	Greiner BioOne, Nürtingen, D
Mikrotestplatten, 96er-Well	Sarstedt, Nürnbrecht, D
Neubauerzählkammer	Optik-Labor, Friedrichshofen, D
Pasteurpipetten 5 ml, 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, US
PCR-Rack	Roth, Karlsruhe, D
Pipetten, 0,5-1000 µl	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, F
Pipettenspitzen mit Filter, steril; 0,1-1000 µl	Gilson, S.A.S., Villiers le Bel, F
Pipettenspitzen PP natur; 0,5-1000 µl	Sarstedt, Nürnbrecht, D
PVDF Hybond Membran	Amersham, Buckinghamshire, GB
Reaktionsgefäß, Multi Safe Seal Tubes	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Reaktionsgefäß, Safe Lock; 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße, 0,2 ml Streifen	Nerbe Plus GmbH, Winsen, D
Spritzenaufsatz Millex® GP, 0,22 µm Filter	Millipore Carrigtwohill, Cork, IRL
Zellkulturflaschen T-75, T-25 cm²	Greiner BioOne, Nürtingen, D
Zellkulturschalen 6 cm, 6-Well	BD, Heidelberg, D
Zellscraper	Greiner BioOne, Nürtingen, D

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial und Hilfsmittel

### 2.1.3 Verwendete PC-Programme

Bezeichnung	Hersteller
Gen5 <sup>TM</sup>	BioTek, Winooski, US
GeneTools	Syngene, Cambridge, UK
Graph Pad Prism	Graph Pad Software Inc., San Diego, US
Image Lab	Bio-Rad Laboratories, München, D

Bezeichnung	Hersteller
Mendeley	Mendeley Ltd., London, UK
Microsoft Word & Excel 2003	Microsoft Corp., Redmond, WA, US
SDS 2.3	Applied Biosystems®, Foster City, CA, US

Tabelle 3: Verwendete PC-Programme

#### 2.1.4 Verwendete Lösungen und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt, D
A549-Kulturmedium, RPMI 1640 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 10.000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml	PAN, Biotech, Nürnberg, D Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D PAN, Biotech, Nürnberg, D
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl ROTH, Karlsruhe, D
APS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua Ecotainer®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Aqua, RNase-, DNase-free	Gibco, Qiagen GmbH, Hilden, D
Aqua Stabil	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Chloroform für die Spektroskopie, Uvasol	Merck, Darmstadt, D
DMSO (Dimethyl sulfoxide $\geq 99,5\%$ )	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
DNTP	Fermentas Life Sciences, St. Leon – Roth, D
DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Ethanol >99,5% reinst	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 70% vergällt	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethidium Bromid	Roth, Karlsruhe, D

Bezeichnung	Hersteller
GLUT-1-Antikörper 37782	Pierce, Thermo Scientific, Schwerte, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin >99%	Roth, Karlsruhe, D
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe, D
HIF-1 Antikörper, 610959	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Human SCF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
Human VEGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
Kristallviolett	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Molekulargewichtsstandard, GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, US
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	Fermentas Life Sciences, St. Leon – Roth, D
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte, D
Platinum SYBR Green, qPCR SuperMix- UDG	Invitrogen, Carlsbad, CA, US
Primer	biomers GmbH, Ulm, D
Revert-Aid M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas Life Sciences, St. Leon – Roth, D
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas Life Sciences, St. Leon – Roth, D
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
Schwefelsäure 1mol/L	Roth, Karlsruhe, D
SDS solution	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, D
Slim Milk Powder	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo-Scientific, Bonn, D

Bezeichnung	Hersteller
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo-Scientific, Bonn, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Substanzen

### 2.1.5 Pufferzusammensetzungen

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
10x TAE-Puffer	40 mM TRIS	Roth, Karlsruhe, D
	1 mM EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz	Merck, Darmstadt, D
	1% Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
6x Proben-Puffer	0,4% (w/v) Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, D
	50% (v/v) Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
	1 mM EDTA (pH 8,0)	Roth, Karlsruhe, D
Laemmli Puffer (4x)	0,25 M Tris pH 6,8	Roth, Karlsruhe, D
	8% SDS	Roth, Karlsruhe, D
	40% Glycerol	Merck, Darmstadt, D
	ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O	
Elektrophoresepuffer	15,1 g Tris	Roth, Karlsruhe, D
	94 g Glycin	Roth, Karlsruhe, D
	in 900 ml ddH <sub>2</sub> O lösen	
	50 ml 10% SDS, ad 1000 ml	Roth, Karlsruhe, D
10x Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,8	Roth, Karlsruhe, D
	20% SDS	Roth, Karlsruhe, D
	50% Glycerol	Merck, Darmstadt, D
	0,3% Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, D
	9% Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, D
Transferpuffer	3,02 g Tris (25 mM)	Roth, Karlsruhe, D
	14,4 g Glycin (192 mM)	Roth, Karlsruhe, D
	200 ml 20% Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
	Ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Blockingpuffer	1x PBS	Merck, Darmstadt, D
	0,1% Tween	Serva, Heidelberg, D
	7,5% Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, D
Strippingpuffer	5 ml 1 M Glycin	Roth, Karlsruhe, D
	500 µl rauchende HCl (37%)	Merck, Darmstadt, D
	45 ml ddH <sub>2</sub> O	

Tabelle 5: Pufferzusammensetzungen

### 2.1.6 Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Lösung	Zusammensetzung			Hersteller
	<b>5%</b> (Sammelgel)	<b>8%</b> (HIF-1)	<b>10%</b> (GLUT-1)	
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	1,7 ml	5,4 ml	6,6 ml	Serva, Heidelberg, D
ddH <sub>2</sub> O	5,7 ml	9,4 ml	8,2 ml	Gibco, Hilden, D
Tris, 1,5 M/0,5 M	2,5 ml (pH 6,8)	5,0 ml (pH 8,8)	5,0 ml (pH 8,8)	Roth, Karlsruhe, D
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml	Roth, Karlsruhe, D
10% Ammoniumpersulfat	100 µl	200 µl	200 µl	Sigma, Taufkirchen, D
Temed	5 µl	10 µl	10 µl	Sigma, Taufkirchen, D

Tabelle 6: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

## 2.2 Versuchsaufbau

### 2.2.1 Versuchsgruppen

Es wurden je drei unabhängige Versuchsgruppen gebildet, um die Auswirkungen der verschiedenen Sauerstoffzustände auf Zellwachstum, Proliferation, Gen- und Proteinexpression unter Bestrahlung und nicht bestrahlter Kontrollgruppe zu vergleichen. Bei den Versuchen wurde jeweils in Triplets gearbeitet.

1. Normoxie: Die A549-Zellen befanden sich während des gesamten Versuches in einer

Umgebung von mindestens 21% Sauerstoff bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C.

2. Hypoxie: Diese Gruppe wurde für eine Zeit von 24 h in den Hypoxieinkubator mit 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C gestellt. Um zu gewährleisten, dass die Zellen auch unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt werden konnten, wurden für diese Gruppe nicht luftdurchlässige Deckel verwendet. Da sich herausstellte, dass bei von Beginn an fest verschlossenen Deckeln sich keine Hypoxie in den Zellen einstellte, wurden die Deckel vorerst nur leicht aufgesetzt. So wurde ein Milieuaustausch zwischen den Zellen in den Kulturflaschen und der Sauerstoff reduzierten Luft in dem Hypoxieinkubator gewährleistet. Beim Öffnen des Inkubators mussten die nur leicht verschlossenen Deckel schließlich innerhalb von 30 Sekunden fest zugeschraubt werden, um die hypoxischen Bedingungen auch während der Bestrahlung beizubehalten.

Eine zusätzlich eingeführte Vergleichsgruppe, die bereits unmittelbar nach den 24 Stunden in der Hypoxiekammer mit Trifast gestoppt wurden, zeigte, dass mit diesem Verfahren eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  erzeugt und beibehalten werden konnte.

3. Reoxygenierung: Wie auch die Hypoxiegruppe wurden diese Zellen über 24 h in den Hypoxieinkubator gestellt. Nach diesem Sauerstoffmangel wurden die Zellen aus dem Hypoxieinkubator entnommen, unter Raumatmosphäre bestrahlt und während des restlichen Versuchablaufs wie die Normoxiegruppe behandelt.

Diese Gruppen wurden wiederum in 3 Untergruppen eingeteilt: Zwei Untergruppen wurden bestrahlt (eine mit Photonen, die andere mit Schwerionen), die dritte Untergruppe wurde nicht bestrahlt. Insgesamt wurden also neun Gruppen verglichen (Tab. 7):

<b>Kontrolle</b>	<b>Photonenbestrahlung</b>	<b>Schwerionenbestrahlung</b>
Normoxie	Normoxie	Normoxie
Hypoxie	Hypoxie	Hypoxie
Reoxygenierung	Reoxygenierung	Reoxygenierung

**Tabelle 7: Versuchsgruppen**

Für Zellzählung und Koloniebildungstest wurden die Zellen aller Gruppen nach dieser Behandlung unter atmosphärische Sauerstoffbedingungen ausgesät. Bis zur Auswertung (max. 7-10 Tage) verblieben die A549-Zellen im Brutschrank bei mindestens 21% Sauerstoff.



Es wurden 500.000 A549-Zellen auf eine T25-Flasche ausgesät. 24 Stunden später wurden die jeweiligen Gruppen für weitere 24 Stunden in den Hypoxieinkubator gestellt bzw. im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Gruppen vier bis neun bestrahlt.

Das Diagramm zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments:

- Zeitstrahl:** Von der Zellaussaat bis zum Versuchsende oder der Aussaat.
- Zeitpunkte:** 24 h und 48 h.
- Bedingungen:**
  - Normoxie:** Standardbedingung.
  - Hypoxie:** Dauerhaftes Sauerstoffmangel.
  - Reoxygenierung:** Zeit in 1% O<sub>2</sub> (zwischen 24 h und 48 h).

## 2.3 Bestrahlung

Die Photonenbestrahlung der Zellen fand in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie mit dem Linearbeschleuniger Elekta Synergy der Firma Elekta mit einer Beschleunigungsspannung von 6 MV statt. Die Zellkulturflaschen hatten einen Abstand von 105 cm zum Fokus des Beschleunigers und wurden von unten bestrahlt. Dabei hatte der Tisch eine Höhe von 100 cm und die Zellkulturflaschen lagen auf 5 jeweils 1 cm hohen  $RW_3$ -Platten mit wasser-äquivalenter Dichte ( $RW_3$ : 1,045 g/cm<sup>3</sup>, Wasser: 1,0 g/cm<sup>3</sup>). Aufgrund der Rückstrahlung wurde eine weitere  $RW_3$ -Platte auf die Zellkulturflaschen gelegt.

Alle photonenbestrahlten Zellen wurden mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt.

### **2.3.2 Schwerionenbestrahlung**

Die Schwerionenbestrahlung fand am Schwerionensynchrotron (SIS) der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) Darmstadt statt. Bei den insgesamt 3 Strahlzeiten mit Kohlenstoffionen ( $^{12}\text{C}$ ) betrug die mittlere Energie 127,5 MeV/u, der SOBP (Spread out bragg peak) lag bei 10 mm (LET 70 keV/ $\mu\text{m}$ , Energie 120-135 MeV/u SOBP). Um zu gewährleisten, dass der Strahl senkrecht auftraf, mussten die Zellkulturflaschen aufgestellt werden. In Voruntersuchungen ergab sich kein Hinweis auf hierdurch hervorgerufene Veränderung bezüglich Expression der untersuchten Gene.

Nach vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden alle Zellen mit der zur Photonenbestrahlung biologisch äquivalenten Dosis von 2 Gy bestrahlt (Kamlah et al., 2011).

## **2.4 Zellkultur**

### **2.4.1 Zelllinie und Kultivierung**

In der Zellkultur wurde die humane Adenokarzinomzelllinie „A549“ (ATCC (American type culture collection)-NR.: CCL-185) verwendet. Hierbei handelt es sich um nicht kleinzellige Bronchialkarzinomzellen (Lieber, Smith, Szakal, Nelson-Rees, & Todaro, 1976).

Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, standen die Zellen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank. Außerdem wurden alle Materialien vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erhitzt. Dreimal in der Woche wurden die Zellen mit RPMI-Kulturmedium unter der Sterilbank passagiert. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen, danach mit Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst, um dann zusammen mit 1 ml FCS (fetales Kälberserum) in ein 50 ml Röhrchen überführt zu werden. Aus der Suspension wurden 10  $\mu\text{l}$  entnommen, um die Zellzahl unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer zu ermitteln. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei ca. 248 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium/1 Mio. Zellen gelöst. Anschließend wurden ca. 1 Mio. Zellen/T75-Flasche in 10 ml Medium ausgesät. Dabei wurde durch kreuzförmiges Verschieben der Zellkulturflaschen eine homogene Aussaat erreicht und diese unter dem Mikroskop kontrolliert.

### **2.4.2 Langzeitkultivierung der Zellen**

Zur Langzeitkultivierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu mussten die Zellen nach einmaligem Waschen zunächst mit Trypsin gelöst, zusammen mit 1 ml FCS in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit DPBS gespült werden. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei ca. 248 g. Dem kurz auf Eis gekühlten Pellet wurde 2 ml des A549-Kulturmediums mit 0,1 ml DMSO zugegeben. Nach sorgfältigem Resuspendieren und Überführen in ein Kryoröhrchen wurden diese zum schonenden Abkühlen in ein Kryo-Einfriergerät gestellt. So konnte eine gleichmäßige Abkühlgeschwindigkeit von 1°C/Minute gewährleistet werden. Nachdem die Kryoröhrchen über Nacht bei -80 °C gelagert wurden, folgte am nächsten Tag die endgültige Konservierung in flüssigem Stickstoff.

Bei erneutem Gebrauch der Zellen für weitere Versuche wurde ein eingefrorenes Kryoröhrchen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Zellen in mit warmen Kulturmedium befüllten Zellkulturflaschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt.

## **2.5 Zellzählung**

Direkt nach Bestrahlung der jeweiligen Gruppe wurden die Zellen von den T25-Flaschen gelöst und in Triplets auf drei 24-Well-Platten ausgesät: Eine Platte für jeden Auswertungszeitpunkt: 24, 72 Stunden und 7 Tage. Dabei wurde bei den nicht bestrahlten Gruppen 5000 Zellen pro Well, bei den bestrahlten Gruppen 10000 Zellen pro Well ausgesät. Die unterschiedliche Zellzahl wurde gewählt, um in beiden Gruppen vergleichbare Wachstumsbedingungen zu schaffen und eine Verfälschung der Ergebnisse durch zu dichte Wachstumsflächen bei den Kontrollgruppen zu verhindern. Nach 24, 72 Stunden und nach 7 Tagen wurden die Zellen mit 120 µl Trypsin gelöst, in 300 µl Medium aufgenommen mit Hilfe der Neubauer Kammer gezählt.

## **2.6 Koloniebildungstest nach Puck und Marcus (1956)**

Eine wichtige Wirkung von Bestrahlung auf Zellen ist der Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit (Herrmann et al., 2006a). Von einer ausreichenden Teilungsfähigkeit spricht man, wenn eine Zelle in der Lage ist, mindestens 50 Kolonien zu bilden. Ist dies nicht der Fall, spricht man von reproduktivem Zelltod. Der Koloniebildungstest ist

somit eine wichtige Methode zur Beurteilung der Toxizität von Bestrahlung.

### 2.6.1 Durchführung

Die A549-Zellen wurden wie oben beschrieben in die verschiedenen Sauerstoffzustände gebracht und bestrahlt. Direkt nach der Bestrahlung wurden die Zellen wie folgt auf 6 cm<sup>2</sup> Wachstumsflächen ausgesät (Tab. 8):

Zellzahl			
	Kontrolle	Schwerionenbestrahlung	Photonenbestrahlung
Normoxie	90	1500	2000
Hypoxie	200	1000	1000
Reoxygenieng	150	1500	2000

**Tabelle 8: Zellzahl für die Aussaat des Koloniebildungstest**

Alle Zellen wurden in 4 ml Medium ausgesät. Nach 10 Tagen wurden die Zellen mit 70% Ethanol fixiert und mit Kristallviolett (1:4 verdünnt mit Wasser) gefärbt.

### 2.6.2 Auswertung

Unter dem Mikroskop wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Aus der ausgesäten Zellzahl und der nun ermittelten Kolonienanzahl konnte die Effizienz der Zellen, Kolonien zu bilden, ermittelt werden. Man erhält die Plattierungseffizienz (PE) (Formel 2).

$PE = \frac{Z_K}{Z_A}$	$Z_K$ = Zahl der gezählten Kolonien $Z_A$ = Zahl der ausgesäten Zellen
------------------------	---

**Formel 2: Berechnung der Plattierungseffizienz**

Daraus wurde dann die Überlebensfraktion (SF: „survival fraction“) ermittelt (Formel 3).

$SF = \frac{PE_x}{PE_0}$	$PE_x$ = Plattierungseffizienz der bestrahlten Gruppe $PE_0$ = Plattierungseffizienz der unbestrahlten Gruppe
--------------------------	--

**Formel 3: Berechnung der Überlebensfraktion**

Die Auswertung der Zellzählungsexperimente erfolgte ebenfalls nach dieser Methode.

## **2.7 RNA-Isolation**

Zur RNA-Isolation wurde peqGOLD TriFast (Methode nach Chomczynski und Sacchi) verwendet. TriFast ermöglicht durch eine Guanidinisothiocyanat/Phenol-Mischung die simultane Isolation von RNA, DNA und Proteinen.

Auch wenn die RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi nicht so schnell wie andere Isolationsmethoden durchführbar ist, hat sie den entscheidenden Vorteil, dass man aus den gleichen Proben auch Proteine (für diese Arbeit von besonderem Interesse) und DNA gewinnen kann. Dies war insbesondere entscheidend, da die Zeiten der Schwerionenbestrahlung in Darmstadt stark begrenzt waren und sind.

Da RNA sehr leicht degradiert, befanden sich die Proben auf Eis und die Materialien wurden mittels Eis gekühlt. Um den Abbau der RNA durch die überall vorhandenen RNasen zu verhindern, wurden nur RNase freie Materialien verwendet und die gesamte Zeit Handschuhe getragen. Zur Homogenisierung wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml TriFast mit Hilfe eines Scrappers von der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurde diese Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe standen die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von Chloroform wurden die Proben gut gemischt und 10 Minuten bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugiert. Man erhält eine Auftrennung in 3 Phasen, die RNA befindet sich in der obersten wässrigen Phase, die DNA in der Interphase und der Proteinanteil in der organischen Phase. Von diesem Schritt an wurden alle Vorgänge auf Eis durchgeführt. Die oberste Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl eisgekühltem Isopropanol pro 1000 µl TriFast vorsichtig gemischt. Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Das die RNA enthaltende Pellet wurde schließlich 2x mit 70% Ethanol (ebenfalls eisgekühlt) durch 10 minütige Zentrifugation bei 10.000 g gewaschen. Nachdem das Pellet kurz trocknete, wurde es jeweils in 25 µl RNase freies Wasser gelöst.

## **2.8 RNA-Messung**

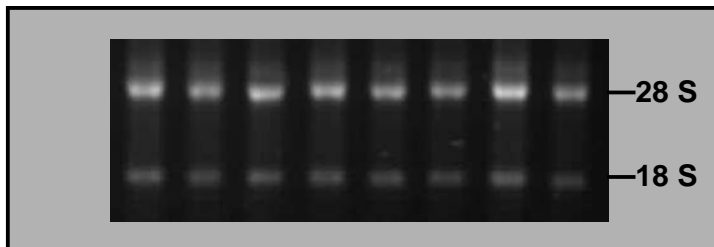
Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Dabei wurden 2 µl der Probe mit 2 µl RNase freiem Wasser verdünnt und je 2 Messungen mit dem Nanodrop

durchgeführt. Zur Kontrolle der Reinheit diente der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260/280 (optische Dichte bei 260 nm und 280 nm), dessen Werte für eine möglichst reine RNA zwischen 1,65 und 2,0 liegen mussten. Außerdem wurde die Integrität der Proben mittels 1% igem Agarose-Gel überprüft.

## ***2.9 RNA Qualitätscheck mittels Agarose-Gel***

Für die Validierung der Qualität der Proben wurden ein 1%iges Agarose-Gel aus 1 g reiner Agarose und 100 ml 1x Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) hergestellt. Nach kurzem Erwärmen auf 140° C wurden 10 µl Ethidium Bromid hinzugefügt. Ethidium Bromid lagert sich in die RNA ein, verändert dabei sein Anregungsspektrum und sorgt so für ein fluoreszierendes Signal unter einem Blaulicht-Transilluminator.

Um die Proben trotz unterschiedlichen RNA-Gehalts gut vergleichen zu können, wurde ein Volumenausgleich auf 10 µl Gesamtvolumen mit jeweils 1 µg RNA durchgeführt. Jeder Probe wurden 4 µl 6x Probenpuffer zugegeben. So konnte der Fortschritt des Laufs kontrolliert werden. Das Gel lief dann bei 80 V, 400 mA für 60 Minuten. Anschließend wurden die Banden in einem Fluorimeter sichtbar gemacht.



**Abbildung 5: Agarose-Gel**

8 intakte Proben mit jeweils zwei getrennten Banden (18 S und 28 S Untereinheit) im Verhältnis 2:1.

Man erkennt intakte RNA durch zwei für RNA spezifische, deutlich getrennte Banden, die die 28 S (bei ca. 4800 bp) und 18 S (bei ca. 1900 bp)-Untereinheit darstellen. Das Verhältnis der beiden Banden sollte 2:1 betragen und zeigt so, dass die RNA nicht degradiert ist. Durch das Verwenden gleicher Mengen RNA (1 µg) sollten die Intensitäten der verschiedenen Proben in etwa gleich sein (Abb. 5).

### ***2.10 cDNA Herstellung***

Alle Proben wurden die gesamte Zeit auf Eis gekühlt, womit ein vorzeitiger Abbau verhindert werden konnte. Um sicherzustellen, dass der quantitative Expressionsunterschied speziell aufgrund der verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt werden kann, sollte die cDNA aller Gruppen mit gleicher RNA-Menge synthetisiert werden. Hierbei wurden jeweils 1 µg RNA verwendet, dann ein Volumenausgleich auf 11,5 µl mit Aqua bidestillata durchgeführt und mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl ergänzt.

Für die spätere PCR ist es wichtig, durch sauberes Arbeiten Verunreinigung durch ubiquitär vorkommende DNA weitestgehend zu vermeiden. Der Vorteil des Oligo(dT)<sub>18</sub> Primers ist, dass er komplette cDNAs synthetisiert. Zur Inkubation und Auftrennung der Sekundärstruktur wurden die Proben nach vorsichtigem Mischen im Thermocycler 5 min auf 65 °C erhitzt und zur weiteren Bearbeitung auf 4 °C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde auf Eis ein Mastermix hergestellt, von dem nach Anhaftung des Primers an die RNA jeder Probe 7,5 µl beigelegt wurde, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Im Mastermix enthalten waren 4 µl Puffer (5x, 250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 2 µl dNTPs (1 mM), 0,5 µl RNase-Inhibitor (20 u), 1 µl M-MuLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, isoliert aus E. coli). Die Reverse Transkriptase stellt aus RNA cDNA (complementary DNA) bis zu einem Molekulargewicht von 13 kb her und arbeitet optimal bei ca. 42 °C. Ein zusätzlicher Vorteil der reversen Transkription ist die gegenüber der mRNA wesentlich stabilere cDNA. Der RNase-Inhibitor verhindert eine vorzeitige Degradation der RNA, indem es die häufigsten RNasen (A, B, C) nicht-kompetitiv bindet.

Nachdem der MasterMix zu jeder Probe hinzugefügt wurde, lief die Reverse Transkription bei 42 °C für 60 Minuten. Um die Reaktion zu beenden wurden die Proben 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und wieder auf 4 °C abgekühlt.

### ***2.11 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion***

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die beliebige Vervielfältigung eines DNA-Moleküls mit bekannten Sequenzen an dessen Enden. Die quantitative PCR erweitert diese Möglichkeit um die Quantifizierung der Amplifikation der Zielsequenz, d.h. ob

eine bestimmte Zielsequenz oder wie in diesem Fall ein bestimmtes Gen unter verschiedenen Bedingungen vermehrt oder vermindert exprimiert wird.

### 2.11.1 Primerdesign

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der NCBI Datenbank für die untersuchten Gene gefunden. Zu den Primerstocklösungen wurden je nach spezifischer Stoffmenge Aqua bidestillata gegeben, sodass eine Lösung von 100 pmol/µl entstand. Zur Herstellung der Mastermixe wurden diese dann noch einmal mit Aqua bidestillata im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Zur Testung der Primereffizienz wurde eine Verdünnungsreihe von 1 bis 1:1024 gemessen. Dabei wurden die  $C_T$ -Werte der einzelnen Verdünnungen gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Mittels linearer Regression (Abb. 6) konnte nun die Steigung der sich ergebenden Geraden errechnet werden. Über die Steigung konnte schließlich die jeweilige Primereffizienz nach folgender Formel ermittelt werden (Formel 4).

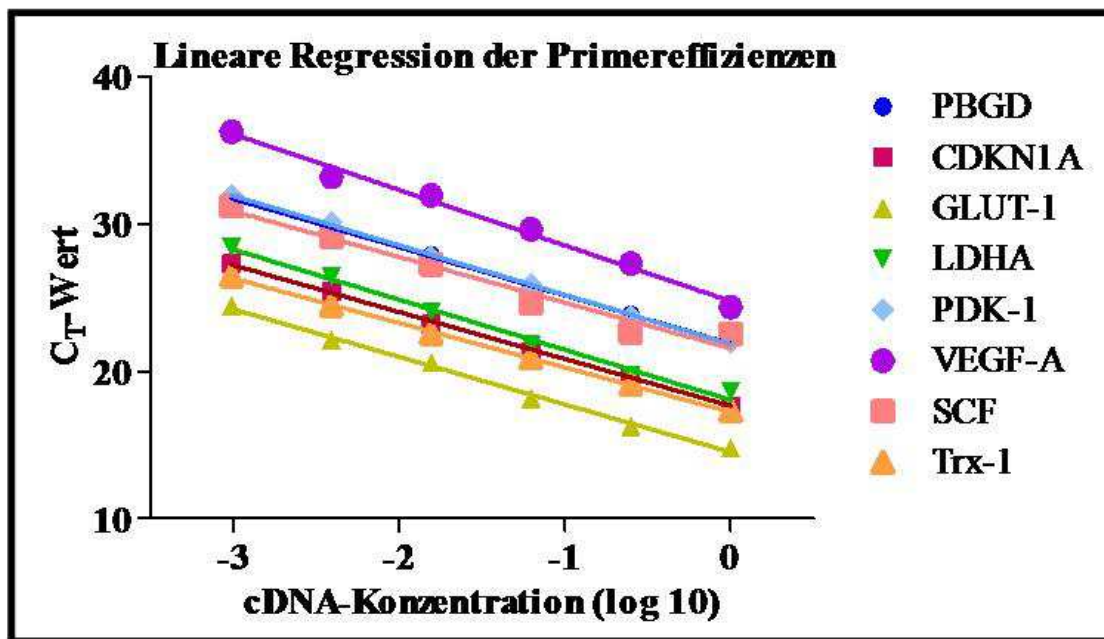


Abbildung 6: Lineare Regression der Primereffizienzen

Die lineare Regression der Primereffizienz wurde anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt.

$$E = 10^{-1/m}$$

E = Effizienz

m = Steigung der Regressionsgeraden

Formel 4: Berechnung der Primereffizienz



Für alle Primer wurde eine gute Effizienz nahe 2 erreicht, sodass sich die gewählten Primer als geeignet erwiesen (Tabelle 9). Einige Primer zeigten eine Effizienz knapp über dem theoretischen Maximalwert von 2, was sich am ehesten über die Verdünnung aller in der cDNA enthaltenden Komponenten erklären lässt und außerdem nur sehr geringfügig war.

Genname	Gensymbol	Primereffizienz E
Porphobilinogen Deaminase	PBGD	2,02
Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	CDKN1A	2,06
Glucose-1-Transporter	GLUT-1	2,04
Lactatdehydrogenase-A	LDHA	1,97
Pyruvatdehydrogenase-Komplex-1	PDK-1	1,98
Vascular endothelium growth factor A	VEGF-A	1,84
Stammzellfaktor	SCF	2,10
Thioredoxin 1	Trx-1	2,14

**Tabelle 9: Ermittelte Primereffizienzen**

Tabellarischer Überblick über die Primereffizienzen der untersuchten Gene. Für die verwendeten Primer ergab sich eine Effizienz von etwa 2.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anhand der Nukleotidlängen der Zielgene mittels Molekulargewichtstandard im Agarose-Gel verifiziert (Abb. 7). Das Agarose-Gel lief unter den in 2.9 beschriebenen Bedingungen der RNA-Elektrophorese. Auf einen Volumenausgleich wurde verzichtet.



**Abbildung 7: Primertestung**

Agarose-Gel der PCR-Produkte zur Spezifizierung der Primer. Die Produkte zeigten das für das jeweilige Gen in der Literatur beschriebene Molekulargewicht.

Primer-bezeichnung	Primersequenz (5' – 3')	Annealing-Temperatur (°C)	Amplifikationslänge
PBGD	F: CAGCTTGCTCGCATACAGAC	59,77	106 bp
	R: GAATCTTGTCCCCTGTGGTG	60,36	
CDKN1A	F: GGAAGACCATGTGGACCTGT	59,82	146 bp
	R: GGC GTTTGGAGTGGTAGAAA	60,11	
VEGF-A	F: AGGCCAGCACATAGGAGAGA	59,97	133 bp
	R: TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT	60,00	
LDHA	F: TGTGCCTGTATGGAGTGGAA	60,11	124 bp
	R: AGCACTCTCAACCACCTGCT	60,06	
PDK-1	F: GGTTACGGGACAGATGCAGT	60,00	109 bp
	R: CGTGGTTGGTGTGTGAATGC	59,89	
GLUT-1	F: CTTCACTGTCGTGTCGCTGT	60,10	195 bp
	R: CCAGGACCCACTTCAAAGAA	60,08	
Trx-1	F: CTTTGGATCCATTTCATCG	60,27	101 bp
	R: CAAGGCTTCCTGAAAAGCAG	60,12	
SCF	F: GGATGGATGTTTGCCAAGT	59,8	172 bp
	R: TCTTTCACGCACTCCACAAG	60,02	

Tabelle 10: Verwendete Primer

### 2.11.2 Durchführung

Für die Real-Time-RT-PCR wurde der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG verwendet. Im SuperMix waren neben der notwendigen TaqDNA-Polymerase auch SYBR Green I als Farbstoff, die Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, sowie die Uracil DNA-Glykosylase (UDG), Puffer und Stabilisatoren enthalten. Durch den Einsatz von dUTP anstelle von dTTP und der UDG konnte ein Verschleppen von PCR-Produkten aus vorherigen Läufen verhindert werden (Pfaffl, 2001). Schließlich wurde je Probe ein MasterMix aus 12,5 µl SYBR Green (inklusive ROX, das vorher hinzugegeben wird), 1 µl Primerlösung des jeweiligen Zielgens (80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Primer fw. und 10 µl Primer rv., sodass die jeweiligen Primerkonzentration 10 pmol/µl betrug), 1 µl MgCl<sub>2</sub> als Reaktionsbeschleuniger und 9,5 µl Aqua bidestillata hergestellt. Zu dem Gesamtvolumen von 24 µl wurde je 1 µl der cDNA jeder Probe in ein Well einer 96-Well-Platte hinzugegeben. Es wurde besonders darauf geachtet, dass

keine Luftblasen in den Ansätzen waren, da diese die Auswertung verfälschen und behindern würden. Schließlich wurde die 96-Well-Platte mit einer Klebefolie abgedeckt, um eine Kontamination und ein Verdampfen der Reaktionslösungen zu vermeiden. Nach 1 minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde folgendes Programm des ABI 7900 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA durchlaufen:

1x 50 °C für 2 Minuten (UDG Inkubation), 1x 95 °C für 2 Minuten (Inaktivierung der UDG, Aktivierung der Taq), 45x den Zyklus aus 95 °C für 5 Sekunden (Denaturierung der doppelsträngigen DNA), 5 Sekunden 60 °C (Annealing der Primer an die nun einzelsträngige DNA) und 10 Sekunden bei 72 °C (eigentliche Verlängerungsphase - extension, die Polymerase vervollständigt die einzelsträngige DNA mit Oligonucleotiden).

Besonders wichtig war es, eine thermostabile Polymerase zu verwenden. Somit wurde sie während der Denaturierungsphase weder zerstört noch inaktiviert. Die Proben wurden zur abschließenden Amplifikation nochmals für 10 Sekunden auf 72 °C und 95 °C für 5 Sekunden erhitzt. Das Produkt wurde beim Primerdesign und einmalig als Kontrolle mittels Agarosegel getestet (s. 3.8).

### 2.11.3 Auswertung

Die Auswertung der PCR erfolgt mit Hilfe eines Referenzgenes, das bei gegebenen Versuchsbedingungen möglichst konstant bleibt. Hier diente Porphobilinogen Deaminase (PBGD) als Referenzgen.

Anhand der Schmelzkurven berechnete die Software  $C_T$ -Werte. Die erhaltenen  $C_T$ -Werte waren antiproportional zur Produktmenge. Aus den  $C_T$ -Werten des Referenzgens und des Zielgens erhielt man die Differenz  $\Delta C_T$  (Formel 5).

$$\Delta C_T = C_{T Z} - C_{T R}$$

$$C_{T Z} = C_T - \text{Wert des Zielgens}$$

$$C_{T R} = C_T - \text{Wert des Referenzgens}$$

**Formel 5: Berechnung des  $\Delta C_T$ -Wertes**

Das bedeutete, dass bei einem Vergleich von zwei Gruppen die Expression geringer wurde, wenn der  $\Delta C_T$ -Wert größer war und gesteigert wurde, wenn der  $\Delta C_T$ -Wert kleiner war. Zum einfacheren Verständnis wurden die  $\Delta C_T$ -Werte daher als  $-\Delta C_T$

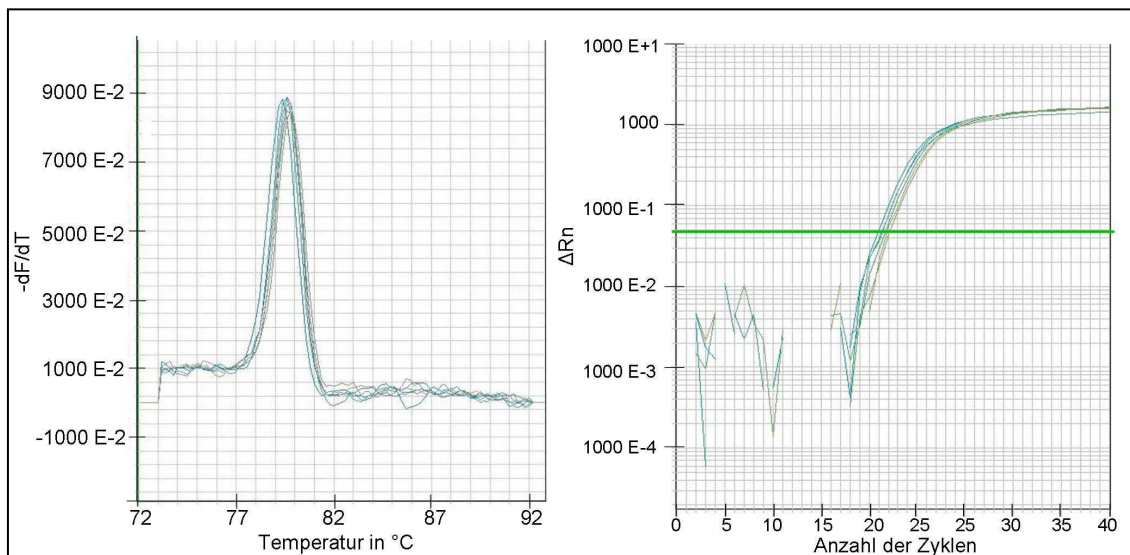
dargestellt.

Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert dargestellt, der sich wie folgt berechnet (Formel 6):

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_B} - \Delta C_{T_K}$	$\Delta C_{T_B} = \Delta C_T$ der behandelten Gruppe $\Delta C_{T_K} = \Delta C_T$ der Kontrollgruppe
--	--

**Formel 6: Berechnung des  $\Delta\Delta C_T$ -Wertes**

Anhand der Schmelzkurven und der Amplifikationskurven konnten die entstandenen PCR-Produkte verifiziert werden. Wichtig war ein einziger Fluoreszenzpeak an der Schmelztemperatur des PCR-Produktes (Abb. 8).



**Abbildung 8: Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf und Amplifikationskurve**

Jedes Gen hat eine spezifische Schmelztemperatur, bei der der DNA-Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen denaturiert. Hierbei wird Fluoreszenz frei, sodass es zu einem Peak kommt. Die Amplifikationskurve ist bei einer erfolgreich abgelaufenen PCR durch einen steilen Anstieg in der 2. Phase der PCR bis zum Annähern an ein Plateau gegen Ende der PCR gekennzeichnet.

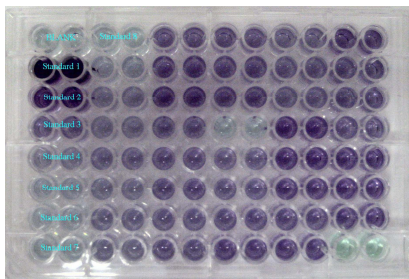
## 2.12 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurde die organische Phase der mit peqGOLD Trifast gestoppten Proben verwendet (s. 2.7 RNA-Isolation). Nachdem die RNA bereits isoliert war, musste die die DNA enthaltende Interphase abgenommen werden. Dann wurde die Proteinfraction gemäß dem Datenblatt von peqGOLD Trifast isoliert. Gelöst wurde die Proteinfraction je nach geschätzter Konzentration in modifiziertem 1x Laemmli-Puffer.

## 2.13 Western Blot

### 2.13.1 Proteinmessung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kit bestimmt. Nach einer Verdünnung von 1:10 in modifiziertem 1x Laemmli Puffer wurde zu je 25 µl der Proben pro Well 25 µl einer Lösung A' zugegeben. Diese wurde zuvor aus Reagenz A (enthält u.a. Bicinchoninsäure – BCA) und B (u.a. Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 hergestellt. Außerdem wurde eine Standardreihe von 0 mg/ml – 2000 µg/ml BSA auf die 96-Wellplatte aufgetragen, zu der ebenfalls je 200 µl Reagenz A' hinzugefügt wurden. Um die Genauigkeit der Messungen zu validieren und zu verbessern, wurde jede Probe 2-mal gemessen. Die Platte blieb nun für 30 Sekunden auf dem Rüttler. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Absorption photometrisch bei 562 nm abgelesen und die Proteinkonzentration daraus errechnet (Abb. 9).



**Abbildung 9: Proteinmessung**

96erWell-Platte nach BCA-Farbreaktion. Anhand einer Standardreihe wurde die Proteinkonzentration mittels der entstandenen Farbreaktion berechnet

### 2.13.2 Diskontinuierliche SDS-Page-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches SDS (Natriumdodecylsulfat)-Page nach Laemmli verwendet. SDS denaturiert die Proteine und sorgt für eine einheitliche Ladung, sodass die Proteine nur abhängig von ihrer molekularen Masse in dem Gel laufen. Da HIF-1α ein Molekulargewicht von 120 kDa hat (G. L. Wang & Semenza, 1995), wurde ein 8%iges Gel verwendet; beim Nachweis von GLUT-1 (Molekulargewicht 55 kDa (Maher, Vannucci, & Simpson, 1993)) ein 10%iges Gel.

Die in der Tabelle 6 ersichtlichen Volumina ergaben die für ein Gel verwendeten Gesamtvolumina: 10 ml für das Sammelgel und 20 ml für die Trenngele. Eine saubere Kante zwischen Trenngel und Sammelgel konnte dadurch erreicht werden, dass nach dem Gießen des Trenngels Ethanol aufgetragen wurde. Dieses wurde als das Trenngel

getrocknet war, entfernt und nochmals mit Aqua bidestillata. gespült. Bei der Herstellung der Gele wurde darauf geachtet, Temed und Ammoniumpersulfat (APS) immer frisch dazuzugeben. Erst als das Trenngel polymerisiert war, wurde auch dem Sammelgel Temed und APS zugefügt. Zur Probenaufbereitung wurde ein Volumenausgleich mit Aqua bidestillata. durchgeführt, sodass jede Tasche 25 µg Protein enthielt. Jeder Probe wurden 3 µl 10x Probenpuffer zugegeben und die Reaktionsgefäße mit einem Loch versehen. So konnte verhindert werden, dass die Reaktionsgefäße bei dem nun erfolgten Kochen für 5 Minuten bei 100 °C platzen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Durch vorheriges Spülen der Taschen konnten die Proben luftblasenfrei aufgetragen werden. In eine Tasche wurde ein Gewichtsstandard zur Orientierung des im Western Blot später nachgewiesenen Proteins aufgetragen. Um ein Ausbuchen der Banden zu verhindern, wurden eventuell frei gebliebene Taschen mit Laufpuffer befüllt.

Das Gel lief 90 Minuten bei 100 Volt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel 15 Minuten im Transferpuffer equilibriert.

### **2.13.3 Durchführung und Auswertung**

Zum eigentlichen Transfer der nun aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran, wurde das Gel wie folgt in die Blotkammer eingefügt: Auf die Kathodenplatte wurde ein Fibre Pad, ein Whatman Paper, das Gel, eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran sowie ein weiteres Whatman Paper und ein Fibre Pad gelegt und mit der Anodenplatte verschlossen. Dabei wurde auf ein luftblasenfreies Auftragen geachtet. Die Membran wurde vorher in der benötigten Größe geschnitten, kurz in Methanol und H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich für 15 Minuten in Transferpuffer getaucht. Der Transfer erfolgte über eine Stunde bei 100 Volt eisgekühlt auf einem Magnetrührer. Anschließend wurde die Membran kurz in Methanol getaucht und mit 0,1% Tween (Polysorbat) in 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen, wurde die Membran für eine Stunde in Blockingpuffer auf einer Wippe inkubiert. Die mit 3-6 ml des verdünnten Primärantikörpers (jeweils 1:2000 verdünnt) versehene Membran verblieb über Nacht auf einem Rollschüttler im Kühlraum.

Am nächsten Morgen wurden die Membranen abgegossen, 2x mit 0,1% Tween in 1x PBS abgespült und 3x für 15 Minuten in diesem Waschpuffer gewaschen. Nun wurde der mit POD (Peroxidase)-gekoppelte Sekundärantikörper (GLUT-1 anti-rabbit

peroxidase 1:20000; HIF-1 anti-mouse peroxidase 1:20000) im Blockingpuffer verdünnt und über eineinhalb Stunden inkubiert. Nach 2x Spülen mit Waschpuffer wurde die Membran erneut 2x 15 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte mit ECL Plus nach Angaben von Amersham.

Um einen Western Blot auch auf andere Proteine untersuchen zu können, wurden die gebundenen Antikörper durch Strippen entfernt. Hierzu wurde die Membran 1 h bei RT auf der Wippe mit dem Strippingpuffer inkubiert. Nach 3-fachem Waschen über jeweils 15 Minuten mit dem Waschpuffer und einstündigem Blockieren der Membran mit Blockingpuffer konnten erneut Antikörper gegen die dann untersuchten Proteine hinzugegeben werden. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin.

Im Anschluss wurden die Schwärzungen der Vergleichsgruppen mittels Densitometrie ausgewertet. Neben dem untersuchten Protein wurden auch die Banden des  $\beta$ -Actins auf deren Schwärzung gemessen. Aus den durch die Software "GeneTools" ermittelten Werten des untersuchten Proteins und des  $\beta$ -Actins der gleichen Probe wurde ein Quotient gebildet, sodass die Expression des untersuchten Proteins in Relation zu der des  $\beta$ -Actins dargestellt wurde.

### ***2.14 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für VEGF und SCF***

Um eine quantitative Aussage über die Konzentration von VEGF und SCF treffen zu können, wurden die Proben mittels ELISA-Kit von R&D Systems untersucht. Hierbei handelt es sich um die sogenannte Sandwich-ELISA-Methode, bei der zwei Antikörper das zu untersuchende Protein an zwei unterschiedlichen Regionen binden. Da sowohl VEGF als auch SCF als Zytokine ihre Funktion als sezernierte Proteine ausüben, wurden die Konzentrationen aus Zellkulturüberständen bestimmt.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit absteigenden Konzentrationen gemäß Herstellerangaben pipettiert. Als Standard diente hierbei rekombinantes humanes VEGF<sub>165</sub> bzw. SCF. Die im Kit enthaltenen Mikrotiterplatten waren bereits mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A/ SCF beschichtet, sodass direkt 50  $\mu$ l des Proteinpuffers pro Well hinzugegeben werden konnten. Anschließend wurden 200  $\mu$ l des Standards, der Kontrolle und der Proben in das jeweilige Well pipettiert. Dabei wurden immer Doppelwerte bestimmt. Die Proben mussten, um im Messbereich des Kits zu liegen, 1:10 verdünnt werden. Nach zwei Stunden Inkubation bei

Raumtemperatur wurde die Titerplatte geleert und 3x mit 400 µl des Waschpuffers von ungebundenen Anteilen gereinigt. Schließlich wurden 200 µl eines Enzym-Antikörper-Konjugats (Meerrettichperoxidase) pro Well hinzugegeben und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Titerplatte geleert und 3x gewaschen. Um nun einen Farbumschlag zu erzeugen, wurden 200 µl einer 15 Minuten vor Verwendung hergestellten Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid) in jedes Well hinzugefügt. Nach einer letzten Inkubationszeit über 20 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µl einer Stopplösung angehalten. Innerhalb von 30 Minuten konnte im ELISA-Reader die Absorption bei 450 nm abgelesen und somit die Konzentration errechnet werden. Aus der Konzentration wurde dann die absolute Proteinmenge bestimmt.

Zur Auswertung wurde jeweils die absolute Menge des untersuchten Proteins [pg] aus den Zellkulturüberständen ins Verhältnis zum Gesamtprotein der Zelllysate (48 h) bzw. der Gesamtzellzahl (24 h und 72 h) gesetzt.

### ***2.15 Statistische Auswertung***

Alle gewonnenen Daten wurden mithilfe der Programme Microsoft Office Excel 2003 und GraphPad Prism 5 ausgewertet und graphisch dargestellt. Dabei wurden für die jeweiligen Vergleichsgruppen Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler berechnet. Als Signifikanztests wurden der gepaarte t-Test (als parametrischer Test) und der Mann-Whitney-Test (als nichtparametrischer Test) angewendet. Die Signifikanzniveaus wurden mit einem ( $p \leq 0,05$ ), zwei ( $p \leq 0,005$ ) oder drei Sternen ( $p \leq 0,001$ ) gekennzeichnet.



### 3. Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurde getestet, ob durch die gewählte Methode (s.2.2.1) HIF-1 abhängige Zielgene unter Hypoxie bzw. unter Reoxygenierung vermehrt exprimiert werden. Im zweiten Teil wurde untersucht, wie sich diese Gene nach Photonen- und bzw. Schwerionenbestrahlung unter den verschiedenen Bedingungen verhalten. Des Weiteren wurde mit Hilfe der Zellzählung und des Koloniebildungstestes das zelluläre beziehungsweise klonogene Überleben der A549-Zellen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen bestimmt.

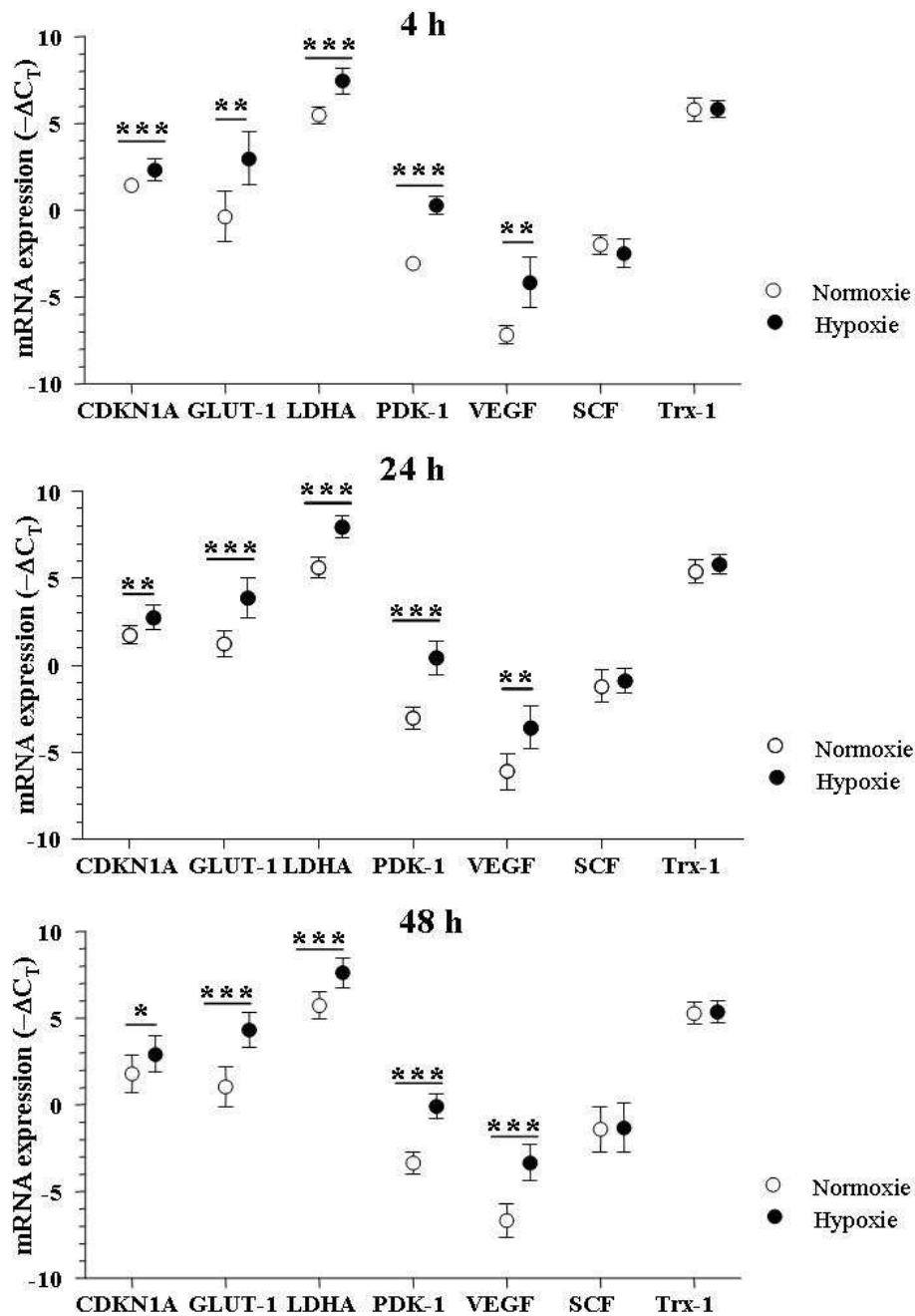
Bei den untersuchten Genen handelte es sich um: CDKN1A (Cyclin dependent kinase inhibitor 1A), der eine wichtige Kontrollfunktion im Zellzyklus hat und vermehrt nach Bestrahlung exprimiert wird; CDKN1A diente daher als Positivkontrolle für eine effektive Bestrahlung; LDHA (Lactatdehydrogenase-A), die als Enzym der Glykolyse für die Energiebereitstellung auch unter hypoxischen Bedingungen zuständig ist; PDK-1 (Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1), die ebenfalls für die alleinige Energiegewinnung über die Glykolyse wichtig ist; GLUT-1 (Glukose-1-Transporter), der Glukose ins Zellinnere transportiert; VEGF (Vascular endothelium growth factor), der als Angiogenesefaktor wesentlich für die Gefäßneubildung eines wachsenden Tumors ist; SCF (Stem cell factor), ein weiterer Angiogenesefaktor und wichtiges Zytokin für Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen sowie Trx-1 (Thioredoxin-1), das als Oxidoreduktase einen Marker für oxidativen Stress darstellt. Dabei zählen LDHA, PDK-1, GLUT-1 und VEGF zu den typischen HIF-1 abhängigen Zielgenen, wohingegen der Zusammenhang zwischen HIF-1 und SCF bzw. Trx-1 noch nicht geklärt ist.

#### ***3.1 Gesteigerte Expression HIF-1-abhängiger Zielgene durch die gewählte Hypoxie- und Reoxygenierungsmethode***

Es wurde die Genexpression von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF-A, SCF und Trx-1 4 h, 24 h und 48 h nach Versuchsbeginn unter verschiedenen Sauerstoffverhältnissen untersucht.

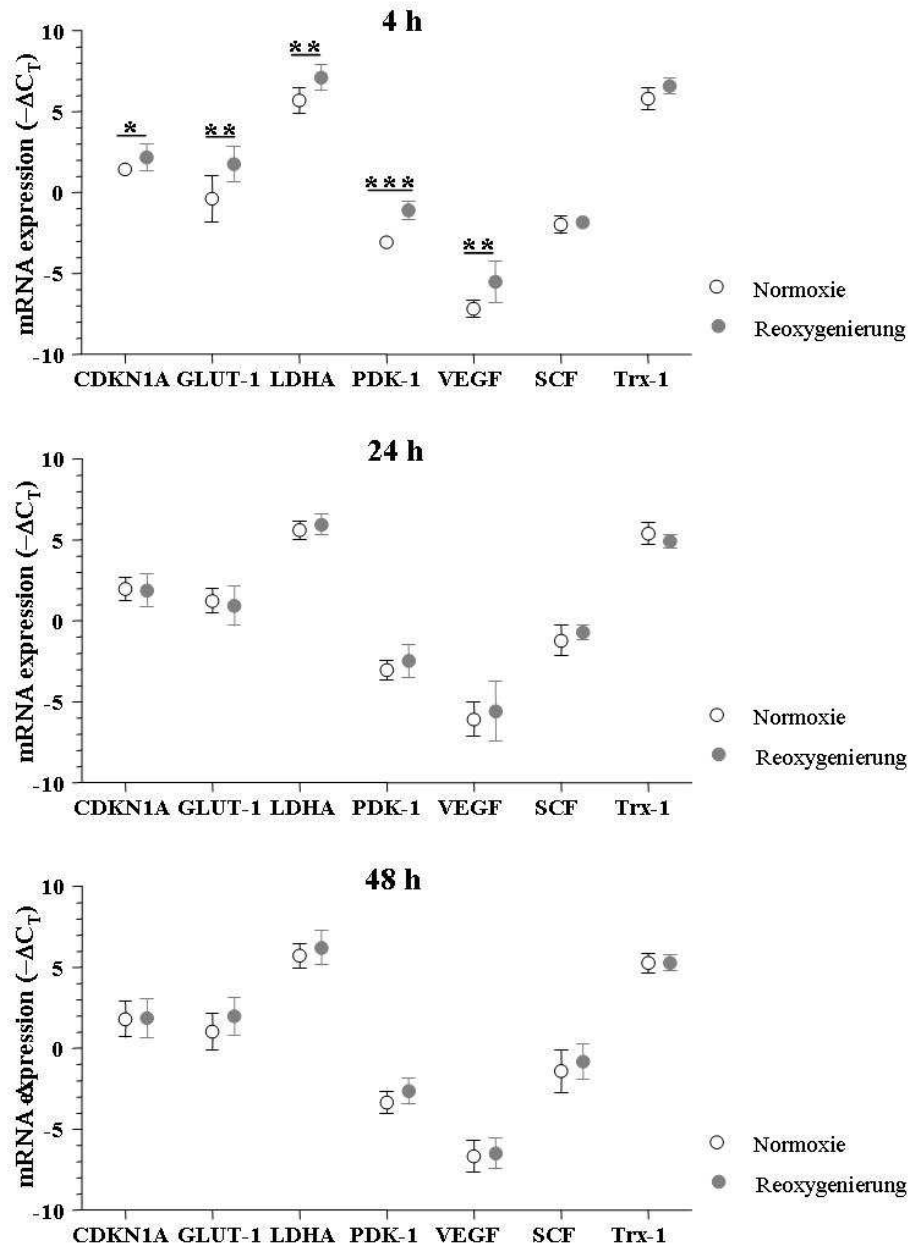
Abbildung 7 zeigt die in der quantitativen Real-Time RT-PCR ermittelten Expressionsunterschiede der oben genannten Gene im Vergleich normoxischer und hypoxischen A549-Zellen zu den Zeitpunkten 4, 24 und 48 h. Es zeigte sich eine

verstärkte Genexpression der HIF-1-abhängigen Zielgene und CDKN1A an allen drei untersuchten Zeitpunkten. Dabei wurde die mRNA-Konzentration von GLUT-1 (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 2,9), LDHA (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 2,0), PDK-1 (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 3,4) und VEGF-A (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 3,1) im Vergleich Hypoxie zur Normoxie um im Mittel 2-4 Zyklen (was bei einer Effizienz von 2 einer Vervierfachung bis Versechzehnfachung entspricht) gesteigert. Die mRNA-Konzentration von CDKN1A (Bestrahlungsmarker) steigerte sich durch Hypoxie leicht (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 0,9). Im Gegensatz dazu veränderte sich weder die Genexpression von SCF (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 0,2) noch von Trx-1 (Mittelwert  $-\Delta C_T$ -Wert 0,1) unter Hypoxie. Unter Reoxygenierung (Abb. 8) zeigte sich, dass nach 4 h die mRNA-Konzentration der HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF sowie CDKN1A anstiegen. Die Expressionssteigerung der CDKN1A mRNA lag im Mittel bei einem  $-\Delta C_T$  von 0,7, wohingegen die Expressionssteigerung der HIF-1-abhängigen Zielgene höher ausfiel (Mittelwerte GLUT-1  $-\Delta C_T$  1,6; LDHA  $-\Delta C_T$  1,7; PDK-1  $-\Delta C_T$  2 und VEGF  $-\Delta C_T$  2,1). Allerdings zeigte sich nach 24 und 48 h kein Unterschied zwischen der reoxygenierten Gruppe und der in Normoxie verbliebenen Kontrolle. Die Expression von SCF und Trx-1 änderte sich durch Reoxygenierung an den untersuchten Zeitpunkten nicht.



**Abbildung 7: Expression von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Normoxie nach unterschiedlichen Zeitpunkten**

Dargestellt ist der  $-\Delta C_T$ -Wert, der bei Anstieg eine Hochregulation des betreffenden Gens repräsentiert. Nach allen drei Zeitpunkten Anstieg der HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF und von CDKN1A durch Hypoxie. Keine Veränderung der Expression von SCF und Trx-1 durch Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 8: Expression von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Reoxygenierung und Normoxie nach unterschiedlichen Zeitpunkten**

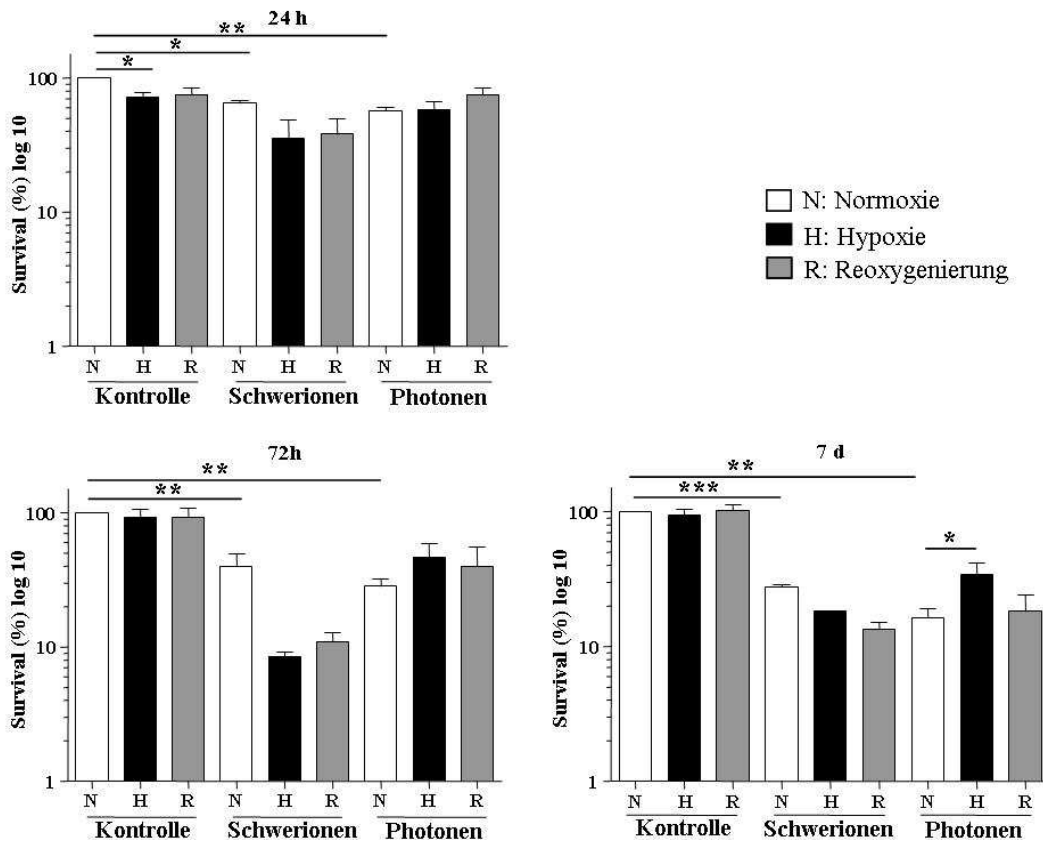
Dargestellt ist der  $-\Delta C_T$ -Wert, der bei Anstieg eine Hochregulation des betreffenden Gens repräsentiert. Nach 4 h Anstieg der HIF-1 Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF und CDKN1A durch Reoxygenierung. Keine Veränderung der Expression von SCF und Trx-1 durch Reoxygenierung. Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \* p < 0,05, \*\* p < 0,005 oder \*\*\* p < 0,001 gekennzeichnet, n ≥ 3. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt.

### ***3.2 Erhöhtes zelluläres Überleben hypoxischer Zellen nach Photonenbestrahlung im Gegensatz zur Schwerionenbestrahlung***

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde im Koloniebildungstest mit normoxischen A549-Zellen ein klonogenes Überleben von 10% bei Verwendung von 6 Gy im Falle der Photonenbestrahlung und 2 Gy im Falle der Kohlenstoffionenbestrahlung bestimmt. Um den Einfluss der verschiedenen Sauerstoffzustände auf das klonogene und zelluläre Überleben nach beiden Bestrahlungsformen zu analysieren, wurde in dieser Untersuchung mit diesen genannten Dosen (biologisch äquivalenten Dosen) gearbeitet. In der Zellzählung wurde nach Photonenbestrahlung ein zur Schwerionenbestrahlung vergleichbares prozentuales Überleben im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Normoxiegruppe der A549-Zellen festgestellt (Photonen: 24 h 57%; 72 h 28%; 7 Tage 16%,  $p < 0,05$ ; Schwerionen: 24 h 54%; 72 h 29%; 7 Tage 28%,  $p < 0,05$ ) (Abb. 9).

In der Kontrolle überlebten unter Hypoxie 24 h nach Versuchsbeginn nur etwa 3/4 der A549-Zellen (prozentuales Überleben im Vergleich zur unbestrahlten Normoxiegruppe 72%,  $p < 0,05$ ). Bei den später untersuchten Zeitpunkten ließen sich keine Veränderungen der Zellzahl unter Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle nachweisen. Die Reoxygenierung hatte keinen Einfluss auf die Zellzahl zu allen Zeitpunkten im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Abb.9).

Hypoxische A549-Zellen zeigten 7 Tage nach Photonenbestrahlung (6 Gy) ein circa 2-fach erhöhtes zelluläres Überleben im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (Photonen [6 Gy]) (Photonen Hypoxie 34% vs. Photonen Normoxie 16%,  $p < 0,05$ ). Dieser Effekt war unter Schwerionenbestrahlung nicht zu beobachten (Abb. 9).



**Abbildung 9: Zelluläres Überleben der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlenqualität nach 24 h, 72 h und 7 Tagen**

Geringeres Zellüberleben der A549-Zellen durch Schwerionen (2 Gy) – und Photonenbestrahlung (6 Gy). Nach Photonenbestrahlung höheres Überleben der unter Hypoxie bestrahlten Zellen gegenüber bestrahlten normoxischen Zellen. Nach Schwerionenbestrahlung kein erhöhtes Überleben unter Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

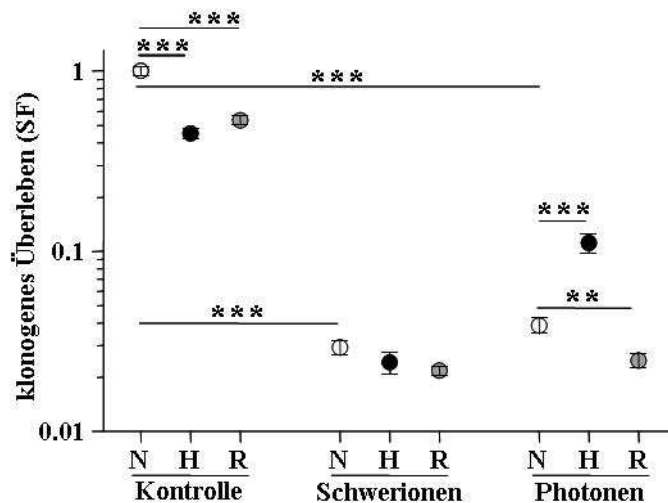
Das klonogene Überleben (SF, Survival Fraction) der A549-Zellen unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen wurde mit Hilfe des Koloniebildungstest 10 Tage nach Bestrahlung bestimmt.

Bei den unbestrahlten Zellen ließ sich Folgendes nachweisen: Hypoxische und reoxygenierte Zellen bildeten im Vergleich zu den normoxischen Zellen weniger Kolonien (Hypoxie SF 0,45; Reoxygenierung: SF 0,50;  $p < 0,001$ ).

In Normoxie wurden nach beiden Bestrahlungsformen erwartungsgemäß weniger Kolonien als in der Kontrollgruppe gebildet (Photonen SF: 0,04; Schwerionen SF: 0,03;  $p < 0,0001$ ).

Nach Photonenbestrahlung hypoxischer A549-Zellen wurden annähernd 3-fach mehr Kolonien im Vergleich zu normoxischen Zellen gebildet (Photonen: Hypoxie SF 0,11

vs. Normoxie SF 0,04,  $p < 0,005$ ). Nach Photonenbestrahlung bildeten reoxygenierte A549-Zellen etwa 2-fach weniger Kolonien im Vergleich zur Normoxie (Photonen: Reoxygenierung SF: 0,02 vs. Normoxie SF: 0,04;  $p < 0,005$ ). Nach Schwerionenbestrahlung ließen sich keine Unterschiede zwischen verschiedenen Sauerstoffbedingungen im klonogenen Überleben nachweisen. (Abb. 10).



**Abbildung 10: Klonogenes Überleben der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlenqualität**

Geringeres klonogenes Überleben der A549-Zellen durch Schwerionen (2 Gy)– und Photonenbestrahlung (6 Gy). Nach Photonenbestrahlung höheres klonogenes Überleben der unter Hypoxie bestrahlten Zellen gegenüber in Normoxie bestrahlten Zellen. Nach Schwerionenbestrahlung kein erhöhtes klonogenes Überleben unter Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

### 3.3 Regulation der mRNA-Expression nach Photonen- gegenüber Schwerionenbestrahlung

In diesem Teil sollte der reine Bestrahlungseffekt in A549-Zellen vergleichend für beide Bestrahlungsformen auf die Genregulation von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 dargestellt werden. Dazu wurde jeweils der relative Expressionsunterschied innerhalb von zwei mit gleichem Sauerstoffgehalt behandelten Gruppen ermittelt, um nur den Bestrahlungseffekt darzustellen. Die Normoxie (N) errechnete sich aus der Differenz des  $\Delta C_T$ -Wertes der bestrahlten Normoxiegruppe dem  $\Delta C_T$ -Wert der unbestrahlten Normoxiegruppe. Die Hypoxie (H) und Reoxygenierung (R) errechneten sich in gleicher Weise (Formel 7).

Somit wurden alle Sauerstoffeffekte hierbei rausgerechnet.

$$-\Delta\Delta C_T(N) = \Delta C_{T\text{NB}} - \Delta C_{T\text{NK}}$$

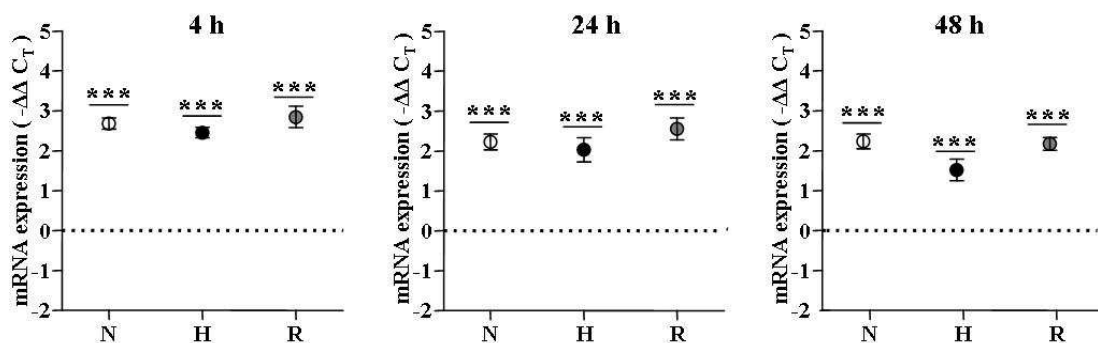
NK = Normoxie, unbestrahlt

NB = Normoxie, bestrahlt

**Formel 7: Berechnung des Bestrahlungseffekts**

### 3.3.1 Expressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Photonenbestrahlung

Nach Photonenbestrahlung zeigte sich 4 h, 24 h und 48 h eine deutliche Hochregulation von CDKN1A unter Normoxie ( $-\Delta\Delta C_T$  4 h 2,7;  $-\Delta\Delta C_T$  24 h 2,2,  $-\Delta\Delta C_T$  48 h 2,2), Hypoxie ( $-\Delta\Delta C_T$  4 h 2,5;  $-\Delta\Delta C_T$  24 h 2,0;  $-\Delta\Delta C_T$  48 h 1,5) und Reoxygenierung ( $-\Delta\Delta C_T$  4 h 2,8;  $-\Delta\Delta C_T$  24 h 2,6;  $-\Delta\Delta C_T$  48 h 2,2). Bei der ermittelten Effizienz von 2 wurde die CDKN1A mRNA somit ungefähr um das 4- bis 9-fache gesteigert ( $p < 0,001$ ) (Abb. 11).

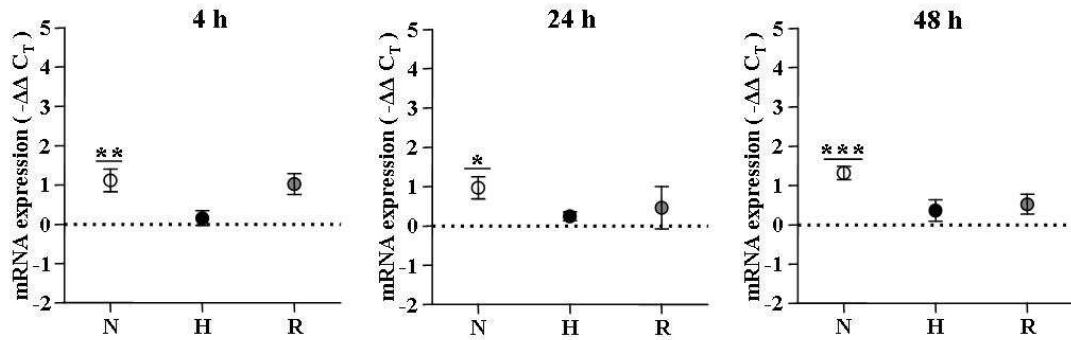


**Abbildung 11: Relative Expression von CDKN1A mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

An allen drei Zeitpunkten zeigte sich eine höhere Expression von CDKN1A mRNA. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt  $-\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt  $-\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt  $-\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

GLUT-1 wurde in der Normoxiegruppe durch Photonenbestrahlung etwa 2-fach hochreguliert. Dies ließ sich 4 h, 24 h und 48 h nach Photonenbestrahlung nachweisen (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  1,2) (Abb. 12). Weder in der Hypoxie- noch in der Reoxygenierungsgruppe ließ sich zu einem der drei Zeitpunkte ein wesentlicher Unterschied der GLUT-1-Expression durch die Bestrahlung erkennen.

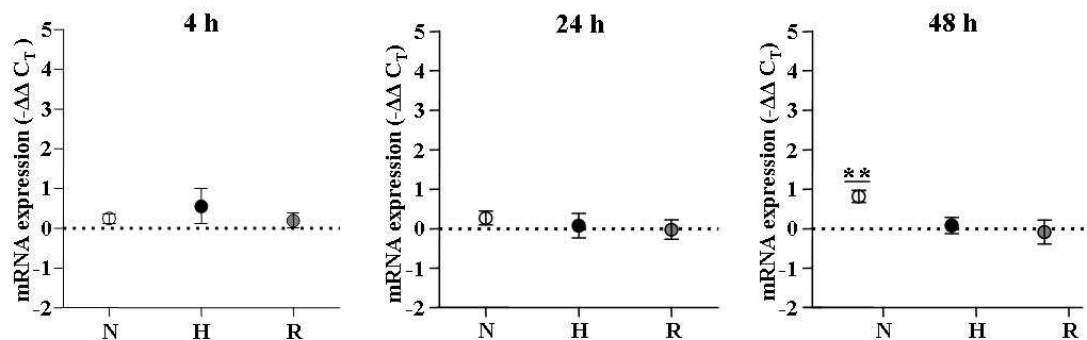




**Abbildung 12: Expression von GLUT-1 mRNA 4, 24 und 48h nach Photonenbestrahlung**

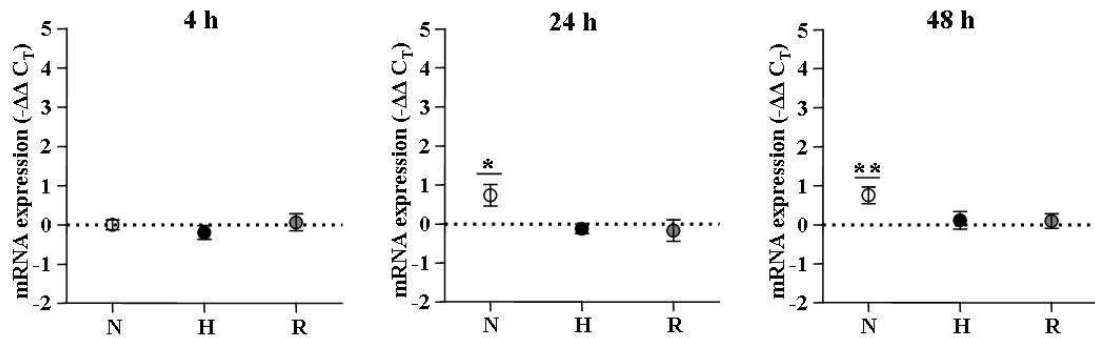
An allen drei Zeitpunkten zeigte sich unter Normoxie durch die Bestrahlung eine höhere Expression von GLUT-1 mRNA. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

LDHA (Abb. 13) zeigte 48 h nach Bestrahlung in der Normoxiegruppe eine etwa 2-fache Hochregulation ( $p < 0,005$ ). PDK-1 (Abb. 14) wurde 24 h und 48 h, VEGF 48 h (Abb. 15) nach Photonenbestrahlung in der Normoxiegruppe 2-fach stärker exprimiert. Die Photonenbestrahlung bewirkte in der Hypoxie- und in der Reoxygenierungsgruppe keine Änderung der mRNA Expression von LDHA, PDK-1 und VEGF.



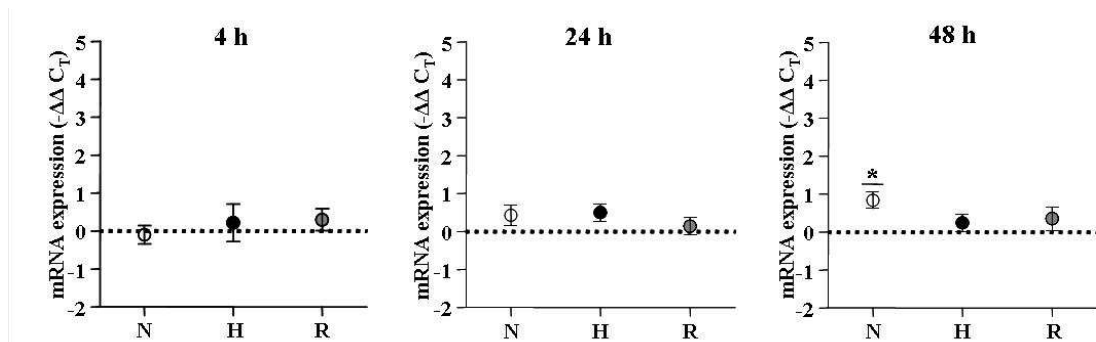
**Abbildung 13: Expression von LDHA mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

Für LDHA zeigte sich nach 48 h unter Normoxie durch die Bestrahlung eine höhere Expression. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 14: Expression von PDK-1 mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

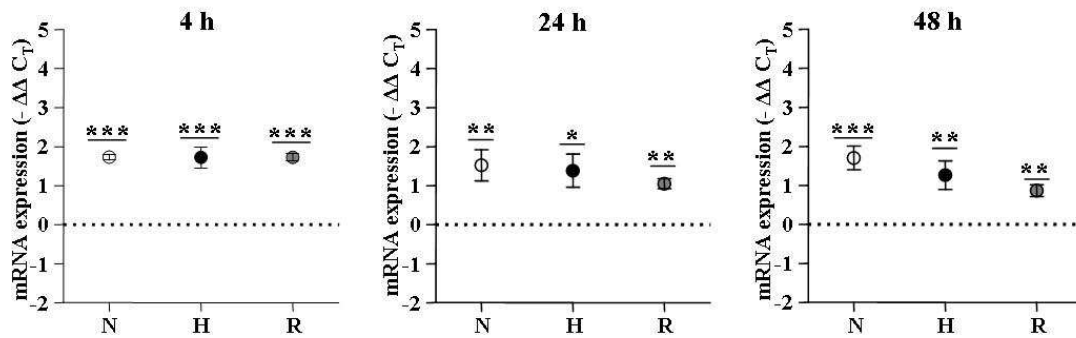
Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zeigte sich unter Normoxie durch die Bestrahlung eine höhere Expression. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 15: Expression von VEGF mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

Für VEGF zeigte sich nach 48 h unter Normoxie durch die Bestrahlung eine höhere Expression. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

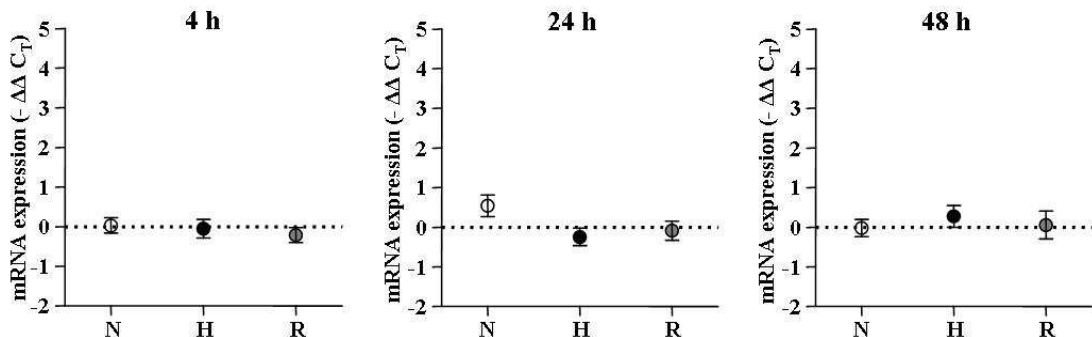
Die mRNA-Expression von SCF wurde in allen Sauerstoffgruppen und zu allen drei Zeitpunkten hochreguliert. Durch die Photonenbestrahlung steigerte sich die mRNA-Expression um etwas das 2- (Reoxygenierung) bis 4- (Normoxie) fache gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrollgruppe (Abb. 16).



**Abbildung 16: Expression von SCF mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

An allen drei Zeitpunkten zeigte sich eine höhere Expression von SCF mRNA unabhängig vom Sauerstoffzustand der A549-Zellen. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Die mRNA-Expression von Trx-1 änderte sich durch Photonenbestrahlung nicht (Abb. 17).



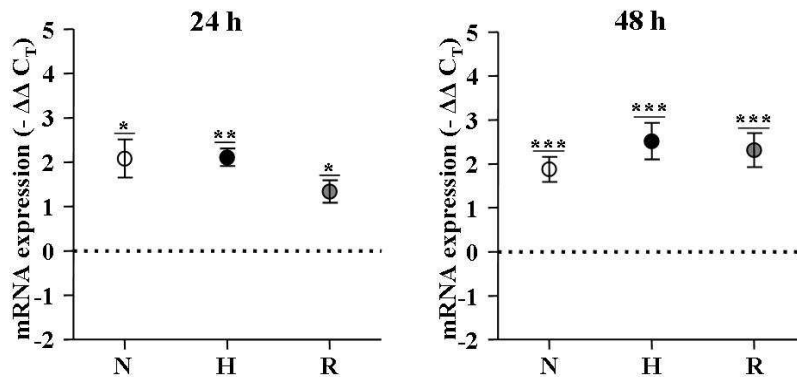
**Abbildung 17: Expression von Trx-1 mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

Unveränderte Trx-1 mRNA Expression. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

### 3.3.2 Expressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene nach Schwerionenbestrahlung

Nach Schwerionenbestrahlung wurde CDKN1A mRNA um das 2- bis über 5-fache (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  2,13) jeweils unter Normoxie, Hypoxie und Reoxygenierung

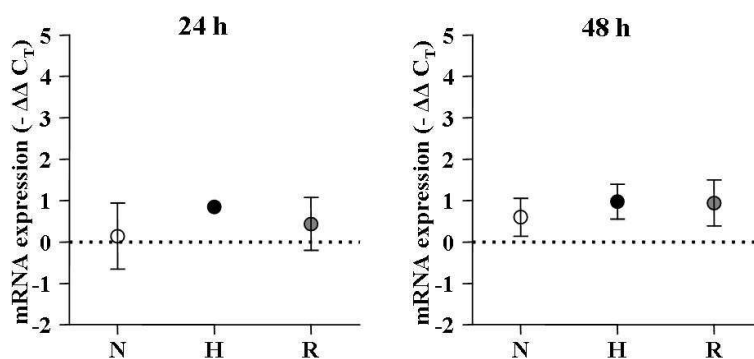
hochreguliert (Abb. 18).



**Abbildung 18: Relative Expression von CDKN1A mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

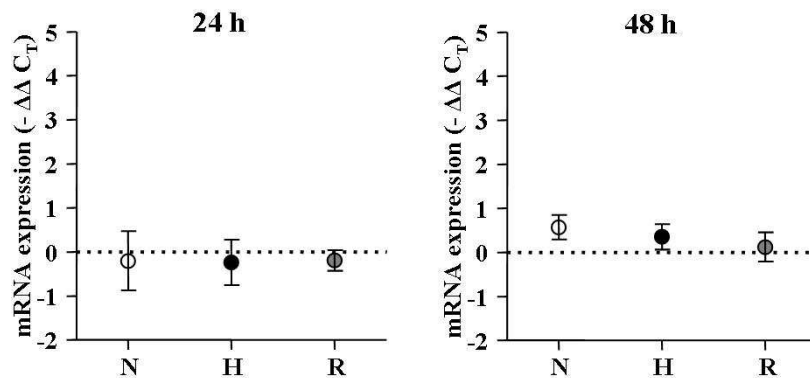
Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich eine höhere Expression von CDKN1A mRNA unabhängig vom Sauerstoffzustand der A549-Zellen. N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Nach Schwerionenbestrahlung veränderte sich die mRNA Expression HIF-1-abhängiger Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF (Abb. 19-22) nicht in den untersuchten Gruppen, es stellten sich keine Expressionsunterschiede im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrollgruppe dar.



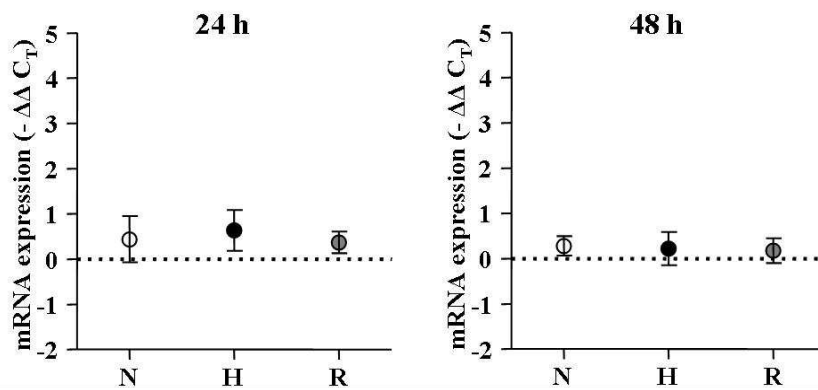
**Abbildung 19: Relative Expression von GLUT-1 mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



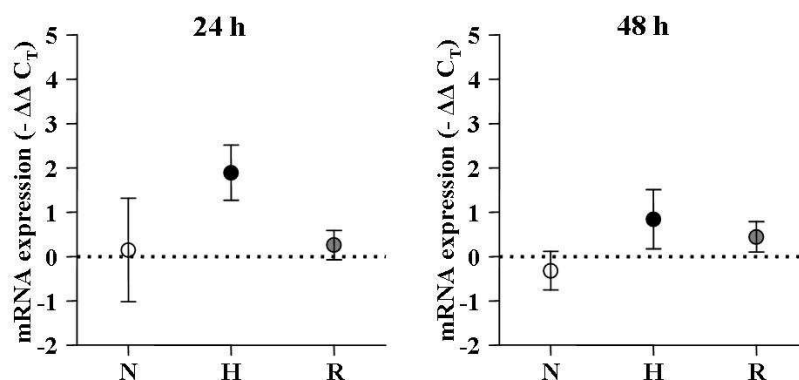
**Abbildung 20: Relative Expression von LDHA mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .



**Abbildung 21: Relative Expression von PDK-1 mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

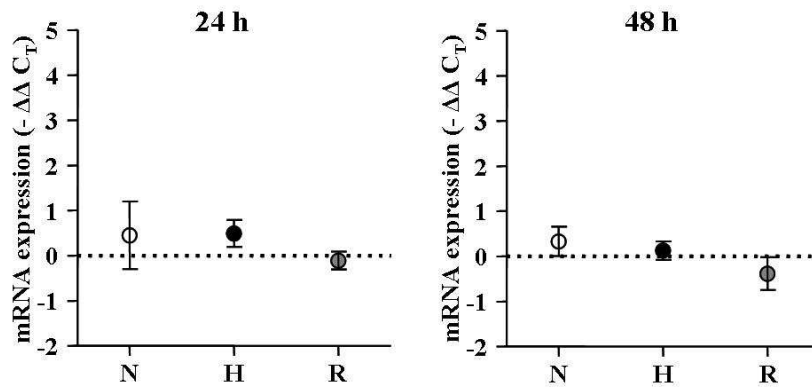
N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 22: Relative Expression von VEGF mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .

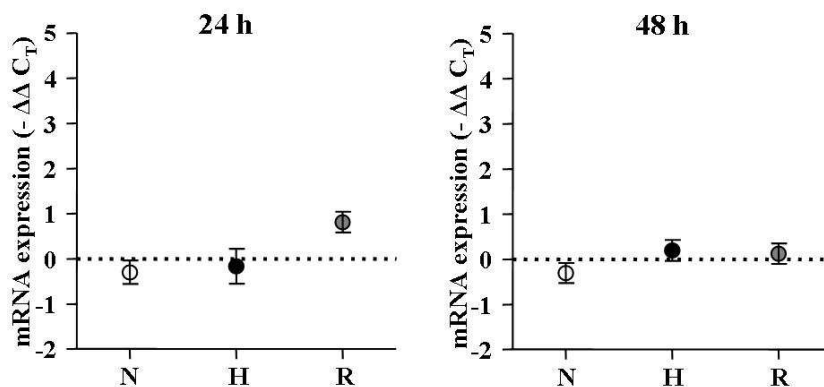
Die mRNA-Expression von SCF änderte sich durch Schwerionenbestrahlung nicht. Weder in Normoxie oder Hypoxie noch in Reoxygenierung konnte nach 24 oder 48 h ein Unterschied der SCF mRNA im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 23).



**Abbildung 23: Relative Expression von SCF mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .

Es zeigte sich nach Schwerionenbestrahlung unabhängig von Zeitpunkt oder Sauerstoffgehalt der Zellen kein Unterschied in der Trx-1 mRNA-Expression (Abb. 24).



**Abbildung 24: Relative Expression von Trx-1 mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Hypoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Reoxygenierung unbestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .

### ***3.4 Induktion HIF-1-abhängiger-Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung in bestrahlten A549-Zellen (Sauerstoffeffekt)***

In diesem Teil sollten die reinen Sauerstoffeffekte in A549-Zellen vergleichend für beide Bestrahlungsformen auf die Genregulation von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 dargestellt werden. Dazu wurden bestrahlte Gruppen miteinander verglichen. Als Kontrolle dienten sowohl bei der Hypoxie- als auch bei der Reoxygenierungsgruppe normoxische, bestrahlte A549-Zellen (Formel 8). Somit würde sich die Normoxiegruppe bei Null darstellen und wird daher in den Abbildungen nicht gezeigt. Der Bestrahlungseffekt wurde rausgerechnet (N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt).

$$-\Delta\Delta C_T(H) = \Delta C_{T\text{HB}} - \Delta C_{T\text{NB}}$$

HB = Hypoxie, bestrahlt

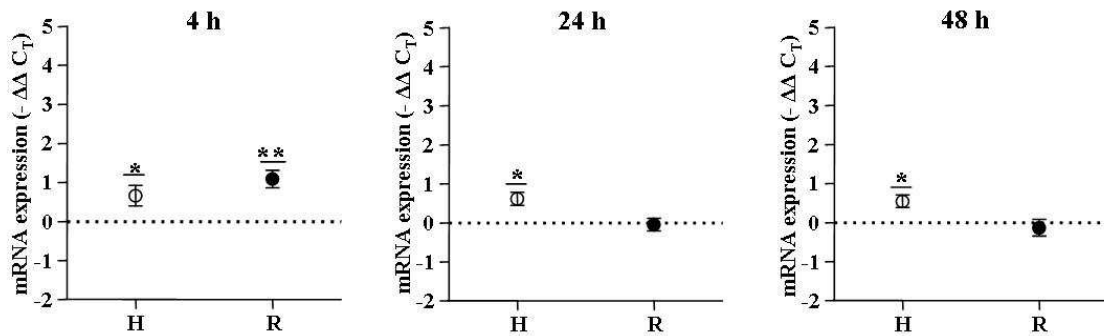
NK = Normoxie, bestrahlt

**Formel 8: Berechnung des Sauerstoffeffektes in bestrahlten Zellen (exemplarisch für Hypoxie, Reoxygenierung äquivalent)**

#### **3.4.1 Genexpressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung in Photonen-bestrahlten A549-Zellen**

Nach Photonenbestrahlung wurde in hypoxischen A549-Zellen CDKN1A mRNA im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle geringgradig mehr exprimiert ( $-\Delta\Delta C_T$ -Wert < 1).

4 Stunden nach Photonenbestrahlung wurde in reoxygenierten A549-Zellen CDKN1A mRNA im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle 2-fach stärker exprimiert. Zu den späteren Zeitpunkten (24 und 48 Stunden) ließen sich keine Unterschiede mehr feststellen (Abb. 25).



**Abbildung 25: Expression von CDKN1A mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

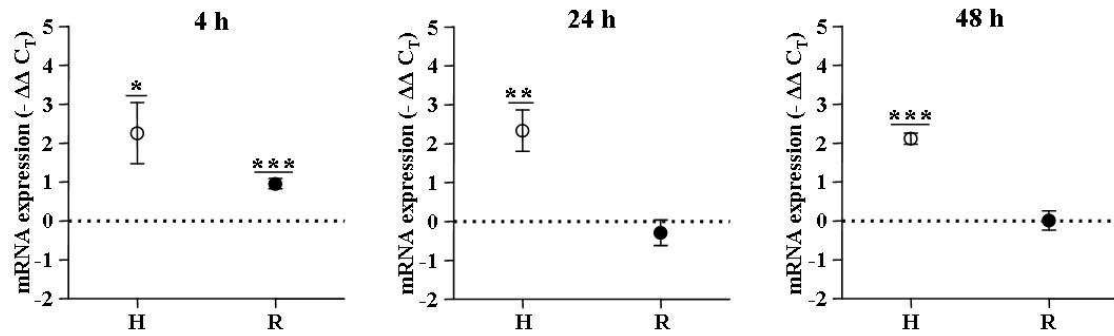
Dargestellt ist der  $-\Delta\Delta C_T$ -Wert, der bei Anstieg eine Hochregulation des betreffenden Gens darstellt. H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Nach allen drei Zeitpunkten Anstieg von CDKN1A mRNA unter Hypoxie und 4 h nach Bestrahlung Anstieg durch Reoxygenierung. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Nach Photonenbestrahlung hypoxischer A549-Zellen steigerte sich die mRNA Expression von GLUT-1 (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  2,22), LDHA (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  1,52) und PDK-1 (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  2,62) sowohl 4 h, 24 h als auch 48 h nach Bestrahlung um das 2- (LDHA) bis 9-fache (GLUT-1, PDK-1) im Vergleich zur bestrahlten normoxischen Kontrolle.

Es wurde 4 h nach Photonenbestrahlung die mRNA Expression von GLUT-1 (Abb. 26, Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  0,95), LDHA (Abb. 27, Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  1,38) und PDK-1 (Abb. 28, Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  2,03) in reoxygenierten A549-Zellen im Vergleich zur bestrahlten normoxischen Kontrolle gesteigert.

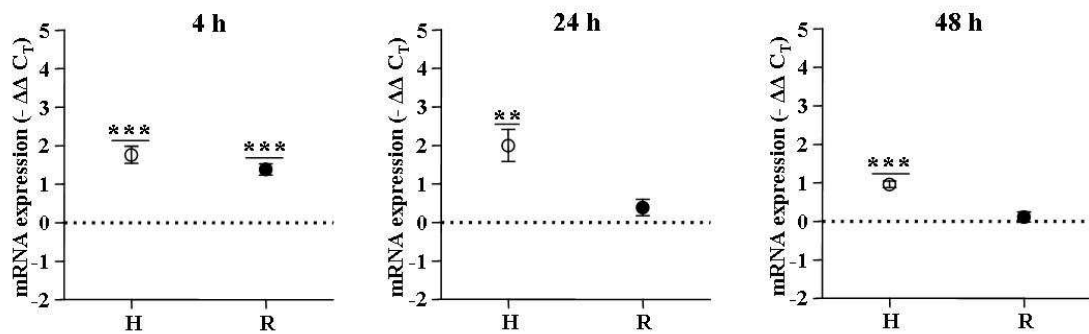
VEGF mRNA wurde sowohl unter Hypoxie (H) als auch unter Reoxygenierung (R) an allen untersuchten Zeitpunkten nach Photonenbestrahlung im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle hochreguliert (4 h (Mittelwert H  $-\Delta\Delta C_T$  4,33, R  $-\Delta\Delta C_T$  1,83), 24 h (Mittelwert H  $-\Delta\Delta C_T$  2,36, R  $-\Delta\Delta C_T$  0,94), und 48 h (Mittelwert H  $-\Delta\Delta C_T$  3,96, R  $-\Delta\Delta C_T$  1,46)), (Abb. 29).





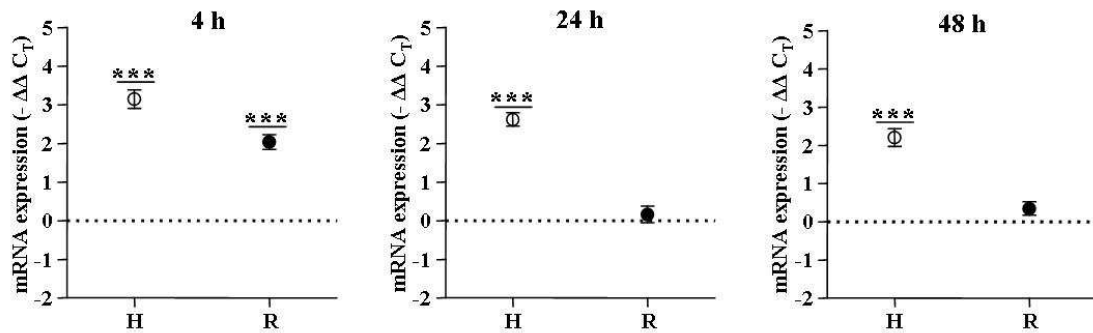
**Abbildung 26: Expression von GLUT-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Nach allen drei Zeitpunkten Anstieg von GLUT-1 mRNA unter Hypoxie und 4 h nach Bestrahlung Anstieg durch Reoxygenierung. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



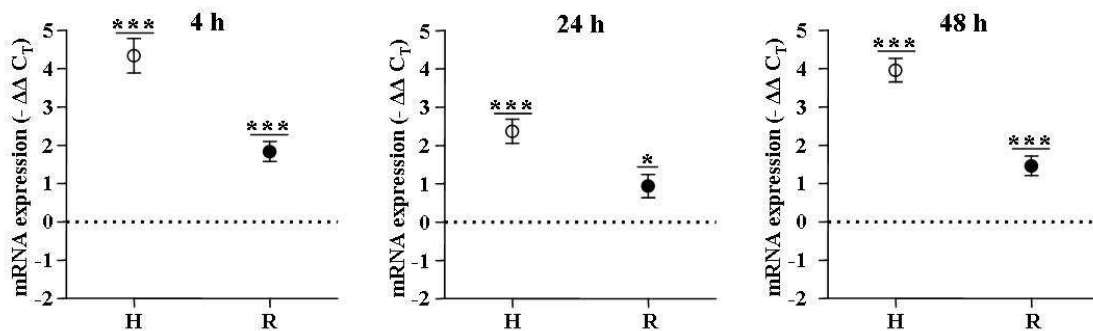
**Abbildung 27: Expression von LDHA mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Nach allen drei Zeitpunkten Anstieg von LDHA mRNA unter Hypoxie und 4 h nach Bestrahlung Anstieg durch Reoxygenierung. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .



**Abbildung 28: Expression von PDK-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

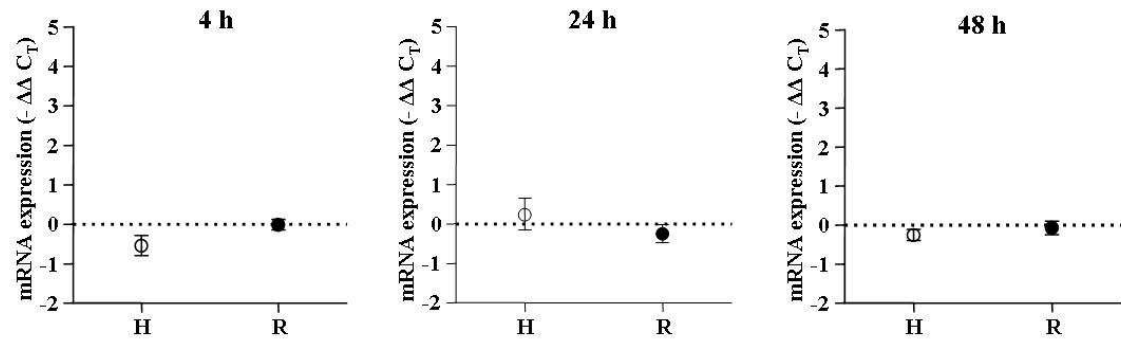
H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Nach allen drei Zeitpunkten Anstieg von PDK-1 mRNA unter Hypoxie und 4 h nach Bestrahlung Anstieg durch Reoxygenierung. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 29: Expression von VEGF mRNA in A 549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

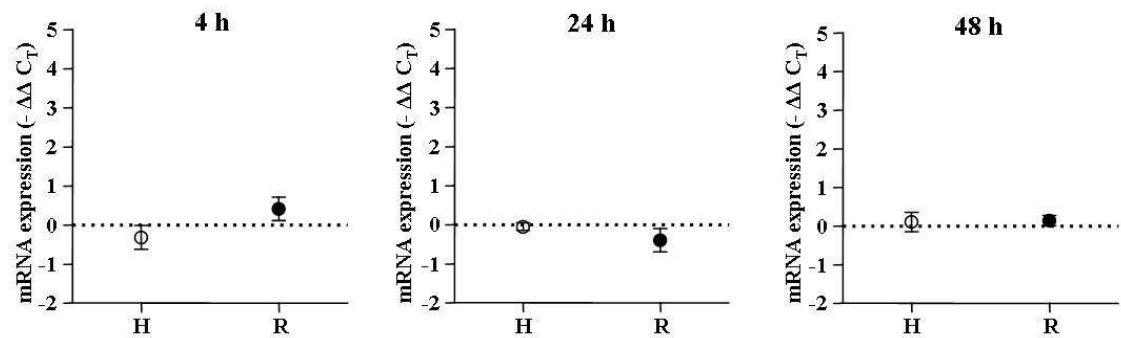
H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Nach allen drei Zeitpunkten Anstieg von VEGF mRNA durch Hypoxie und durch Reoxygenierung. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Weder SCF noch Trx-1 zeigten eine veränderte mRNA Expression durch veränderten Sauerstoffgehalt nach Photonenbestrahlung der Zellen im Vergleich zur normoxischen, bestrahlten Kontrolle. Zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte konnte ein messbarer Unterschied in der Genexpression festgestellt werden (Abb. 30 und Abb. 31).



**Abbildung 30: Expression von SCF mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .

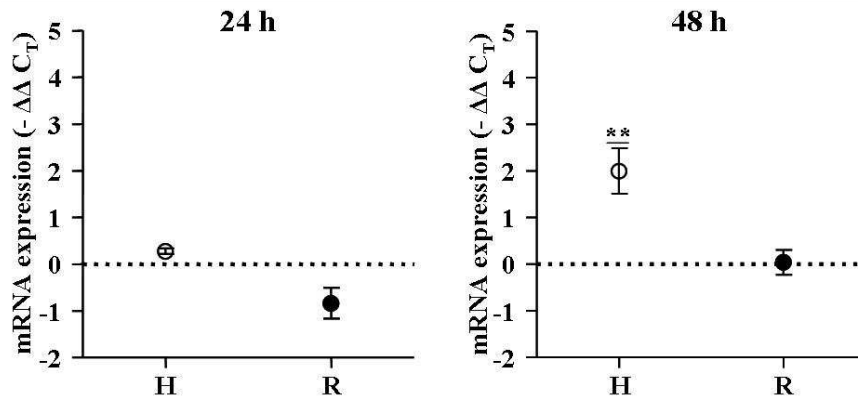


**Abbildung 31: Expression von Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .

### 3.4.2 Expressionsänderung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung in Schwerionen-bestrahlten A549-Zellen

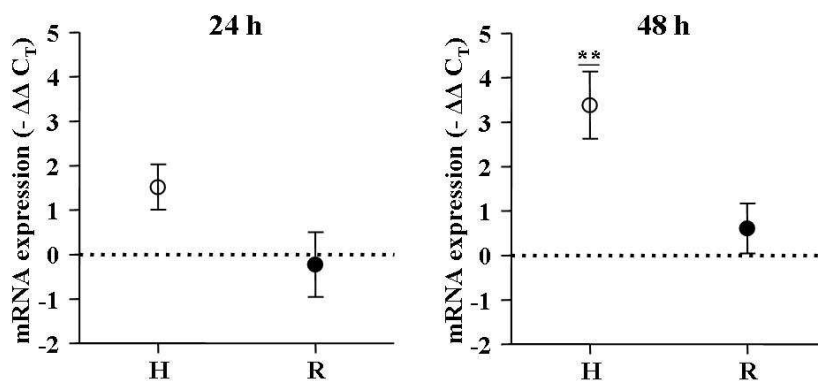
48 h nach Schwerionenbestrahlung wurde CDKN1A mRNA in hypoxischen A549-Zellen im Vergleich zur normoxischen, bestrahlten Kontrolle vermehrt exprimiert (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  2,27). 24 h nach Schwerionenbestrahlung änderte sich die CDKN1A mRNA-Expression in hypoxischen A549-Zellen im Vergleich zur normoxischen, bestrahlten Kontrolle nicht. Nach Schwerionenbestrahlung änderte sich die CDKN1A mRNA-Expression in reoxygenierten A549-Zellen zu beiden Zeitpunkten (24 h und 48 h) im Vergleich zur normoxischen, bestrahlten Kontrolle nicht (Abb. 32).



**Abbildung 32: Expression von CDKN1A mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

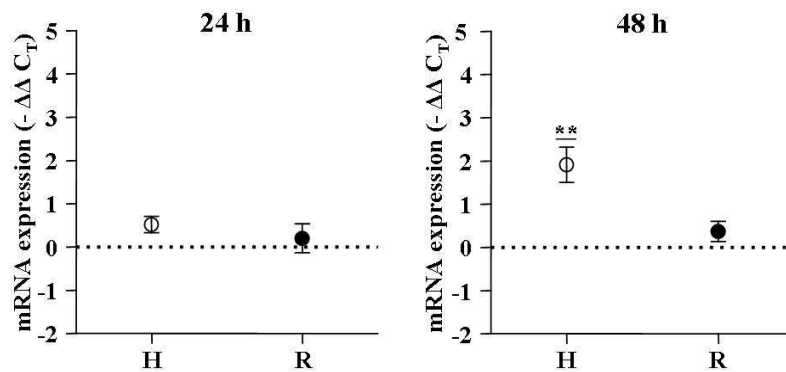
H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. 48 h nach Bestrahlung gesteigerte CDKN1A-Expression durch Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Hypoxische A549-Zellen wiesen 48 h und nicht nach 24 h nach Schwerionenbestrahlung eine deutliche Hochregulation der Gene GLUT-1 (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  3,38) und LDHA (Mittelwert  $-\Delta\Delta C_T$  1,91) im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle auf. Reoxygenierte A549-Zellen wiesen zu beiden Zeitpunkten (24 und 48 h) nach Schwerionenbestrahlung keine Expressionsunterschiede der Gene GLUT-1 und LDHA im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle auf (Abb. 33 und 34).



**Abbildung 33: Expression von GLUT-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. 48 h nach Bestrahlung Anstieg von GLUT-1 mRNA durch Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

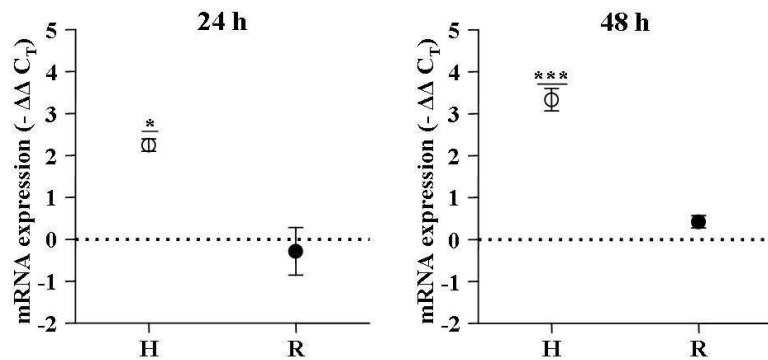


**Abbildung 34: Expression von LDHA mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. 48 h nach Bestrahlung Anstieg von LDHA mRNA durch Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

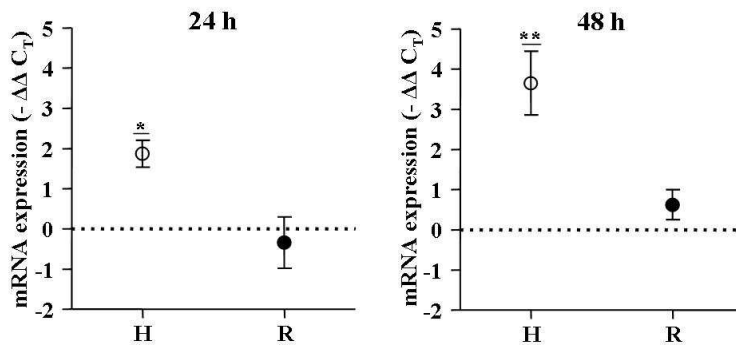
Abbildungen 35 und 36 zeigen, dass PDK-1 und VEGF mRNA 24 h und 48 h nach Schwerionenbestrahlung in hypoxischen A549-Zellen im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle vermehrt exprimiert wurden. Die stärkste Expressionssteigerung stellte sich dabei nach 48 h dar. Bei einem mittleren  $-\Delta\Delta C_T$ -Wert von 3,33 für PDK-1 und 3,65 für VEGF kann mindestens von einer Verneunfachung der ursprünglich exprimierten mRNA ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich in reoxygenierten A549-Zellen im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle 24 h und 48 h nach Schwerionenbestrahlung keine Unterschiede in der mRNA-Expression von PDK-1 und VEGF.

Hypoxische und reoxygenierte A549-Zellen zeigten nach Schwerionenbestrahlung keine mRNA Expressionänderungen der Gene SCF und Trx-1 im Vergleich zur bestrahlten, normoxischen Kontrolle (Abb. 37 und 38).



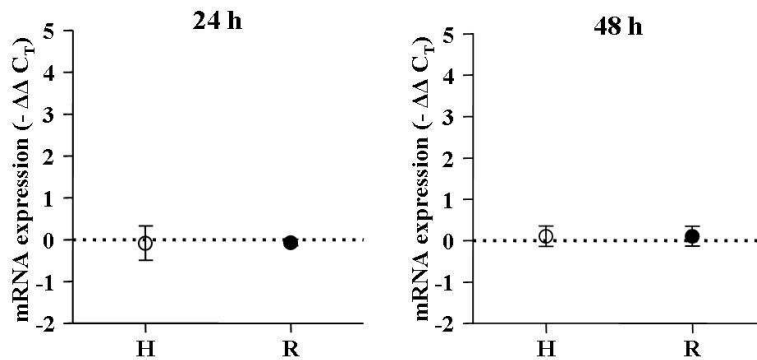
**Abbildung 35: Expression von PDK-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. 24 h und 48 h nach Bestrahlung Anstieg von PDK-1 mRNA durch Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



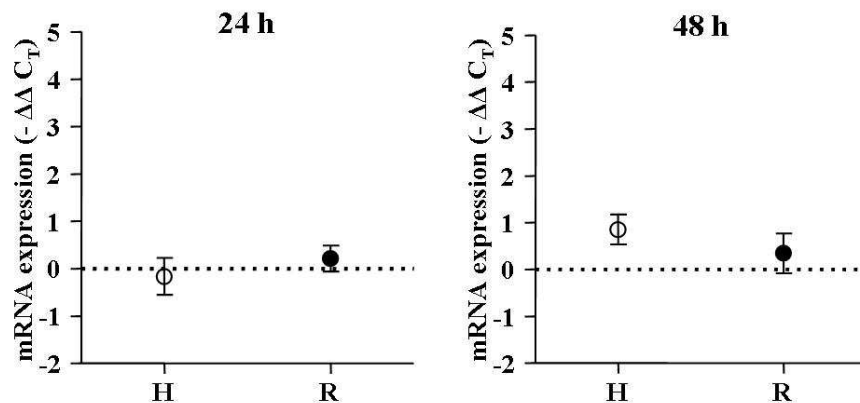
**Abbildung 36: Expression von VEGF mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. 24 h und 48 h nach Bestrahlung Anstieg von VEGF mRNA durch Hypoxie. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\* gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 37: Expression von SCF mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .



**Abbildung 38: Expression von Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung**

H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n \geq 3$ .

### ***3.5 Synergistische Wirkung von Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Bestrahlung auf HIF-1-abhängige Zielgenexpression***

In diesem Teil sollte die differentielle Genregulation von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 weiter analysiert werden. Hierzu wurden der jeweilige Sauerstoffeffekt und der Bestrahlungseffekt beider Bestrahlungsformen in Zusammenhang gestellt und als Gesamteffekt bezeichnet. Zu diesem Zweck dienten die unbestrahlten, normoxischen Zellen als Kontrolle gegenüber bestrahlten, hypoxischen bzw. reoxygenierten A549-Zellen. Der Normoxiegruppe wurde dementsprechend zur Kontrolle die bestrahlten, normoxischen Zellen gegenübergestellt, sodass diese Gruppe

den reinen Bestrahlungseffektes darstellt.

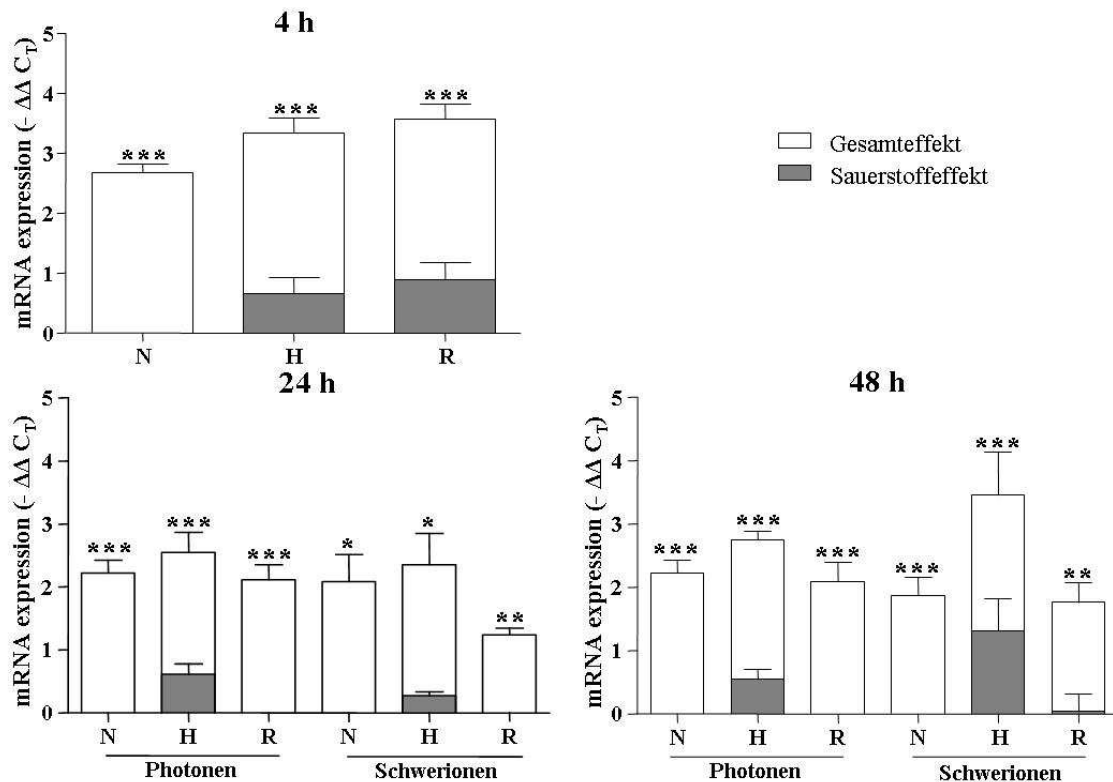
$$-\Delta\Delta C_T (H) = \Delta C_{T\text{HB}} - \Delta C_{T\text{NK}}$$

NK = Normoxie, unbestrahlt  
HB = Hypoxie, bestrahlt

**Formel 9: Berechnung des Gesamteffektes (exemplarisch für Hypoxie)**

In den Abbildungen stellt der graue Anteil der Säulen den Effekt dar, den der Sauerstoffmangel auf das jeweilige Zielgen hatte und der weiße Anteil den Effekt, der durch Bestrahlung und Sauerstoffmangel zusammen verursacht wurde.

CDKN1A mRNA wurde durch beide Bestrahlungsformen zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl in normoxischen, hypoxischen als auch in reoxygenierten A549-Zellen 9- bis 16-fach vermehrt exprimiert. Dabei trug der Sauerstoffeffekt nur einen kleinen Anteil zum Gesamteffekt bei. Die Expressionssteigung von CDKN1A mRNA war hauptsächlich durch die Bestrahlung verursacht (Abb. 39).

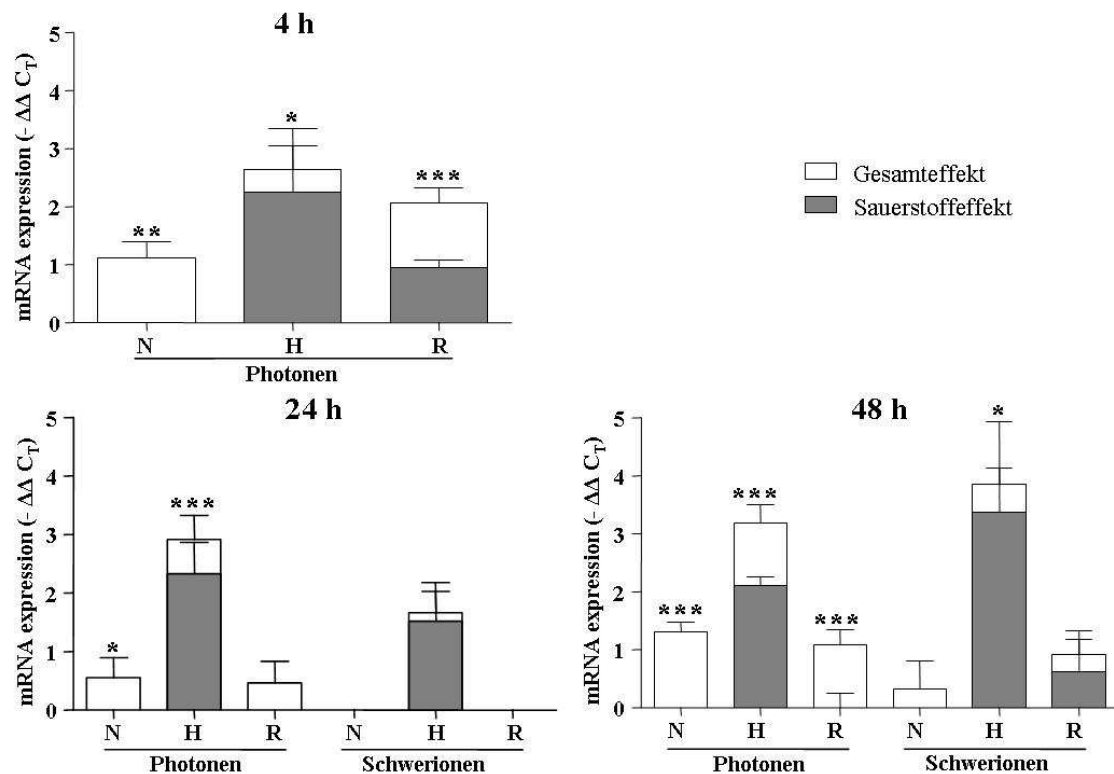


**Abbildung 39: Expressionsverhalten von CDKN1A mRNA nach Bestrahlung und geändertem Sauerstoffgehalt**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.



Nach Photonenbestrahlung wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten GLUT-1 mRNA unter allen Sauerstoffbedingungen 2- bis 9-fach hochreguliert, wobei die Expressionssteigerung durch die Photonenbestrahlung selbst (Bestrahlungseffekt) bei etwa 2 lag und die weitere Expressionssteigerung in hypoxischen und reoxygenierten A549-Zellen durch den Sauerstoffeffekt verursacht war. Nach Schwerionenbestrahlung wurde die GLUT-1 mRNA-Expression nur in hypoxischen und reoxygenierten A549-Zellen gesteigert und war durch den Sauerstoffeffekt bedingt (Abb. 40).



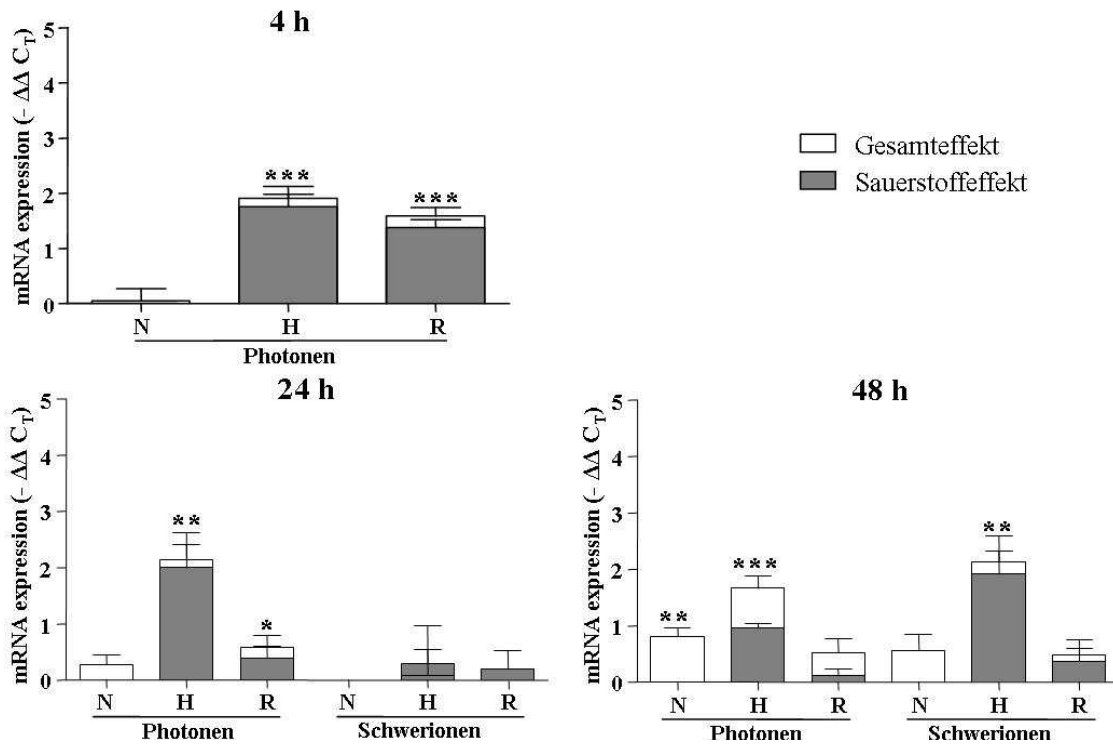
**Abbildung 40: Expressionsverhalten von GLUT-1 mRNA nach Bestrahlung und geändertem Sauerstoffgehalt**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

4 h und 24 h nach Photonenbestrahlung wurde LDHA mRNA in hypoxischen und reoxygenierten A549-Zellen etwa 4-fach stärker exprimiert. Diese Expressionssteigerung war zu großen Teilen durch den Sauerstoffeffekt bedingt. 48 h nach Photonenbestrahlung zeigte sich eine zusätzliche Expressionssteigerung in hypoxischen Zellen im Vergleich zu normoxischen, unbestrahlten A549-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt steigerte sich die LDHA-Expression etwa um das 2-fache auch in den

normoxischen A549-Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 41, vgl. 3.3.1).

Nach Schwerionenbestrahlung wurden sowohl LDHA mRNA (Abb. 41), PDK-1 mRNA (Abb. 42) als auch VEGF mRNA (Abb. 43) 48 h nach Bestrahlung in hypoxischen Zellen im Vergleich zu unbestrahlten, normoxischen Zellen vermehrt exprimiert. Dabei war der Gesamteffekt nahezu ausschließlich durch den Sauerstoffeffekt bedingt. Die Schwerionenbestrahlung verursachte keine weitere Expressionssteigerung.

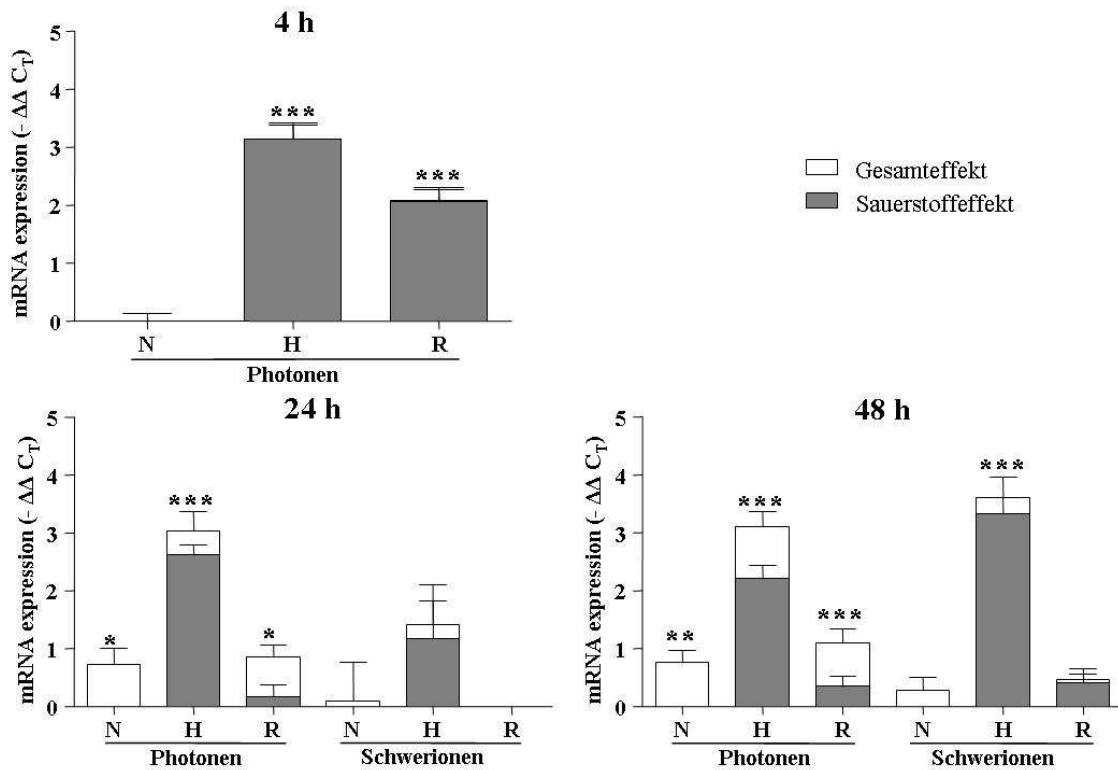


**Abbildung 41: Expressionsverhalten von LDHA mRNA nach Bestrahlung und geändertem Sauerstoffgehalt**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Die PDK-1 mRNA-Expression wurde nach Photonenbestrahlung an allen drei untersuchten Zeitpunkten in der Hypoxie- und der Reoxygenierungsgruppe 2- bis 4-fach hochreguliert. Dabei wurde die Expressionssteigerung insbesondere durch den Sauerstoffeffekt hervorgerufen (etwa 4-fach). Nach 24 h und 48 h wurde dieser Effekt jedoch durch die Photonenbestrahlung bei den reoxygenierten, bestrahlten Zellen verstärkt. Zu diesen beiden Zeitpunkten verursachte auch die Photonenbestrahlung alleine einen Anstieg der PDK-1 mRNA-Expression (Abb. 42: Normoxie, vgl. 3.3.1).

48 h nach Schwerionenbestrahlung wurde in hypoxischen Zellen eine im Vergleich zu normoxischen Zellen gesteigerte PDK-1 mRNA-Expression beobachtet. Durch die Schwerionenbestrahlung selbst zeigten sich keine Expressionsunterschiede.



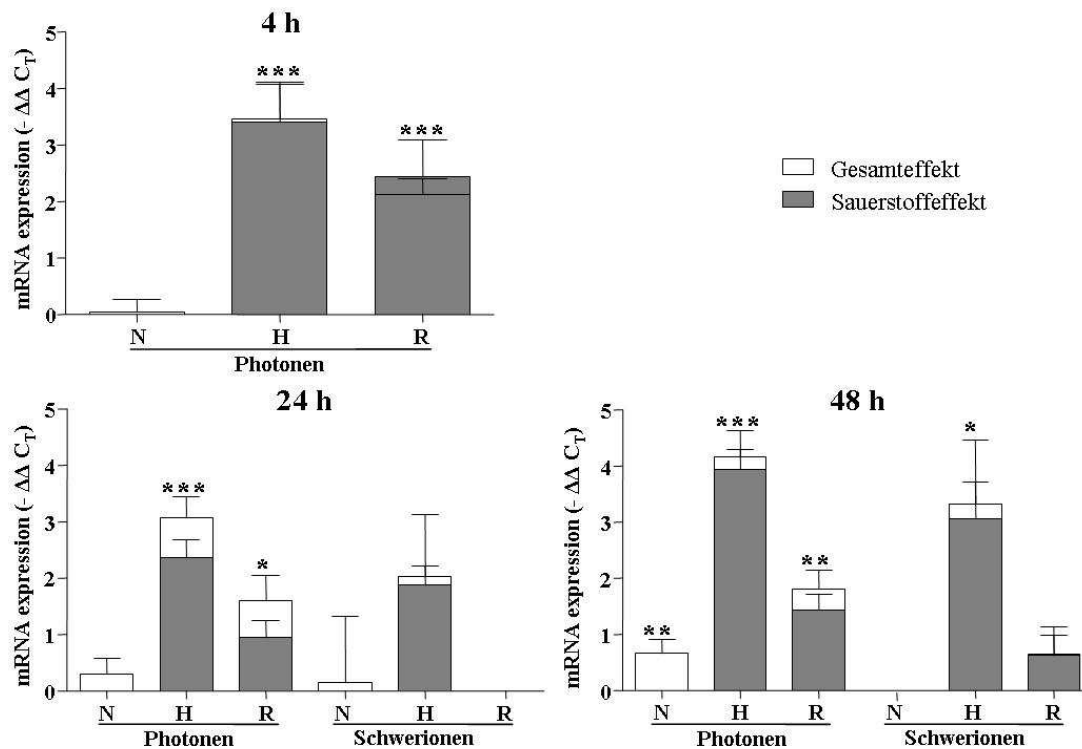
**Abbildung 42: Expressionsverhalten von PDK-1 mRNA nach Bestrahlung und geändertem Sauerstoffgehalt**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Nach Photonenbestrahlung wurde VEGF mRNA nach 4 h, 24 h und 48 h unter Hypoxie und Reoxygenierung 4- bis fast 16-fach stärker exprimiert. Dieser Effekt beruhte im Wesentlichen auf dem veränderten Sauerstoffgehalt der Zellen (Abb. 43).

48 h nach Photonenbestrahlung zeigte sich unter Normoxie ein Anstieg auf etwa das Doppelte der VEGF mRNA-Expression.

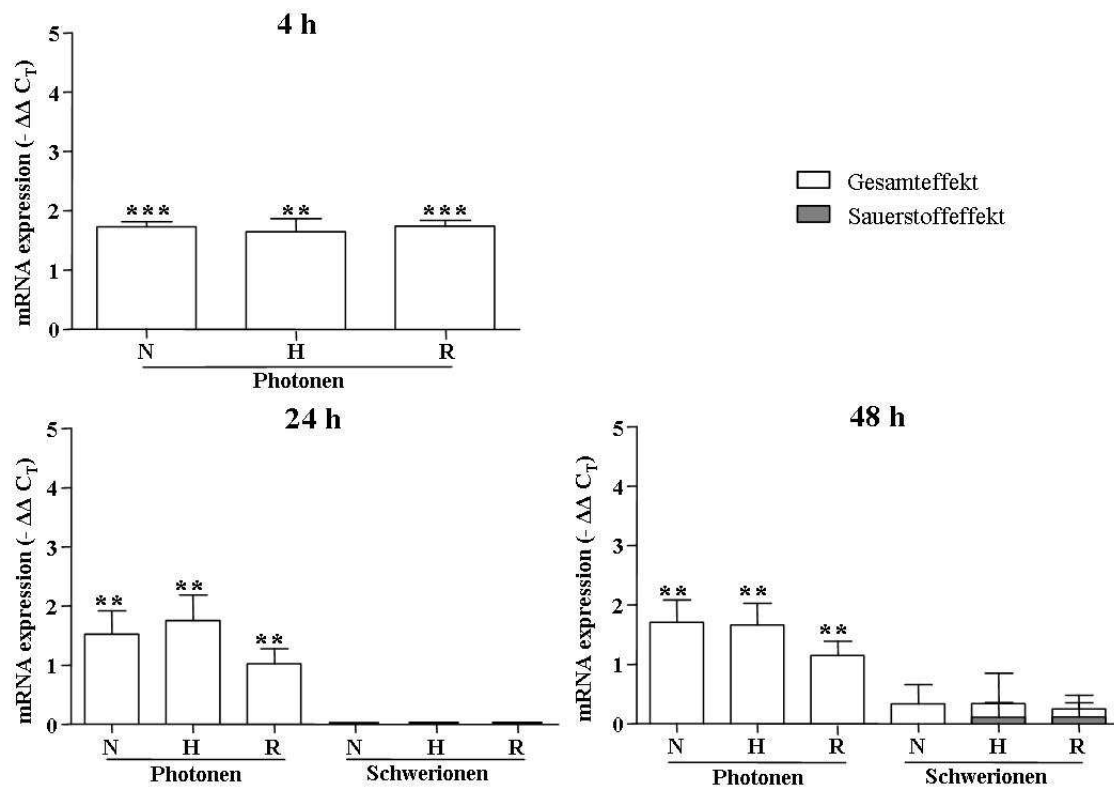
Nach Schwerionenbestrahlung wurde VEGF mRNA nach 48 h unter Hypoxie etwa 9-fach stärker exprimiert. Die Schwerionenbestrahlung selbst verursachte keine weitere Expressionssteigerung.



**Abbildung 43: Expressionsverhalten von VEGF mRNA nach Bestrahlung und geändertem Sauerstoffgehalt**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

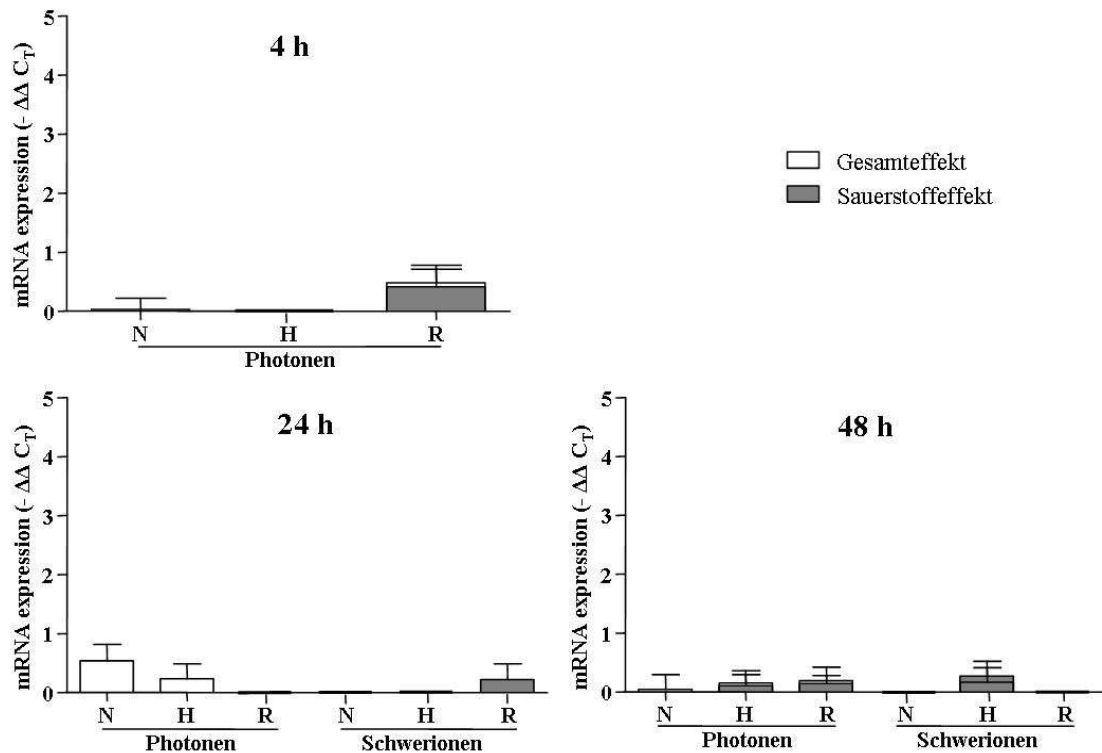
Bei der Regulation von SCF konnte eine Expressionssteigerung insbesondere nach Photonenbestrahlung beobachtet werden. Unter Photonenbestrahlung zeigte sich eine bis zu 16-fache Steigerung der SCF mRNA-Expression nach allen drei untersuchten Zeitpunkten in normoxischen, hypoxischen und reoxygenierten A549-Zellen. Dabei hatten weder Hypoxie noch Reoxygenierung Einfluss auf diesen Effekt. Schwerionenbestrahlung hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Regulation von SCF (Abb. 44).



**Abbildung 44: Expressionsverhalten von SCF mRNA nach Bestrahlung und geändertem Sauerstoffgehalt**

N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Die Regulation von Trx-1 änderte sich durch die gegebenen Versuchsbedingungen nicht. Es ließ sich weder ein Effekt durch veränderte Sauerstoffbedingungen noch durch eine der beiden Bestrahlungsarten feststellen. Auch konnten im Zusammenwirken beider Einflussfaktoren keine Unterschiede gezeigt werden (Abb. 45).



**Abbildung 45: Expressionsverhalten von Trx-1 mRNA nach Bestrahlung und verändertem Sauerstoffgehalt**

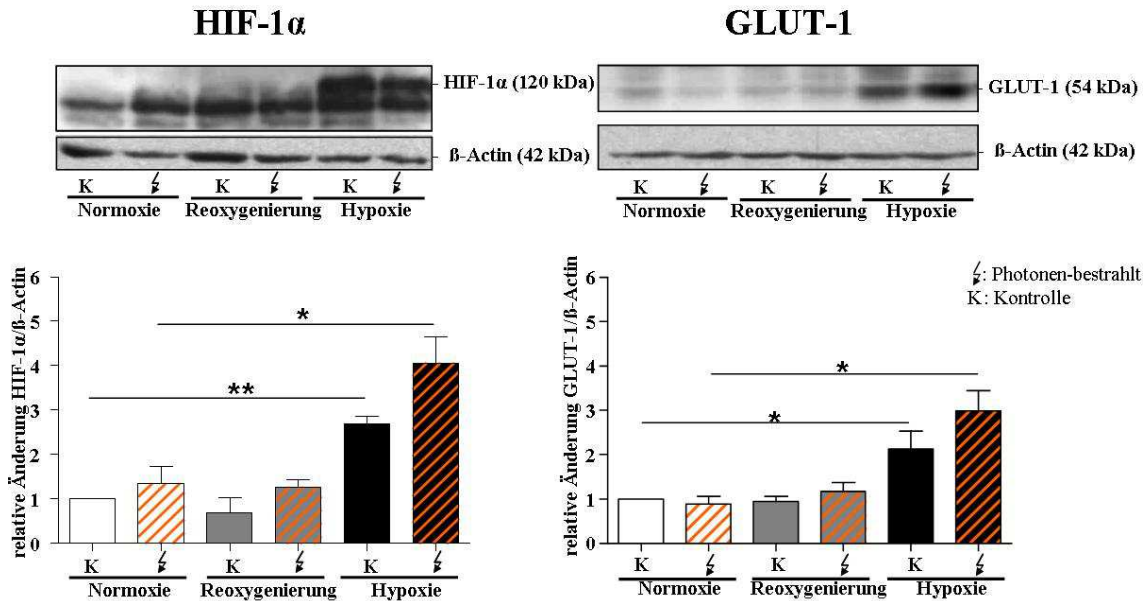
N:  $\Delta C_T$  Normoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, H:  $\Delta C_T$  Hypoxie bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt, R:  $\Delta C_T$  Reoxygenierung bestrahlt –  $\Delta C_T$  Normoxie unbestrahlt. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet,  $n \geq 3$ . Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

### ***3.6 Regulation HIF-1 $\alpha$ und Zielgenen GLUT-1 und VEGF auf Proteinebene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Bestrahlung***

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der Proteinanalysen von GLUT-1 und VEGF exemplarisch als HIF-1-abhängige Zielgene sowie HIF-1 $\alpha$  selbst und SCF bei gleichbleibendem Versuchsaufbau dargestellt werden. Hierzu wurden GLUT-1 und HIF-1 $\alpha$  im Western Blot und anschließender Densitometrie näher untersucht. VEGF und SCF wurden im ELISA untersucht.

Es zeigte sich für GLUT-1 und HIF-1 $\alpha$  in hypoxischen im Vergleich zu normoxischen A549-Zellen eine Konzentrationssteigerung um das 2-3-fache. Reoxygenierung führte nicht zu einer veränderten Proteinkonzentration von HIF-1 $\alpha$  oder GLUT-1. Ebenso übte Photonenbestrahlung auf Proteinebene keinen Einfluss auf die Konzentration von

HIF-1 $\alpha$  und GLUT-1 aus (Abb. 46).

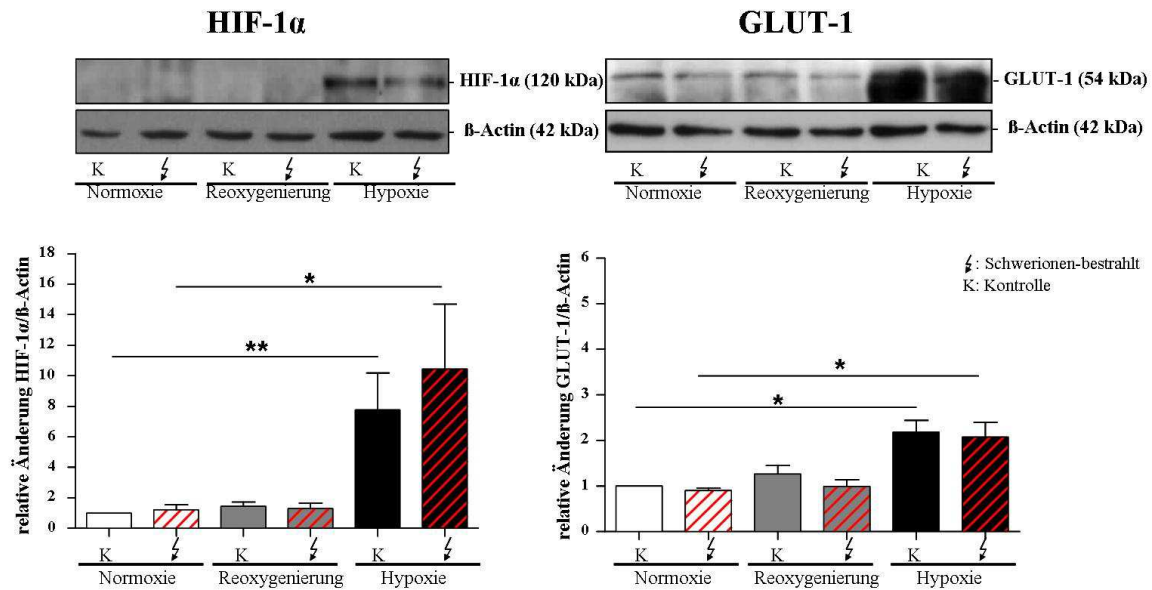


**Abbildung 46: HIF-1 $\alpha$  und GLUT-1 in Western Blot und Densitometrie bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt**

Erhöhte HIF-1 $\alpha$ - und GLUT-1-Konzentration durch Hypoxie in Photonen bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Nach Schwerionenbestrahlung zeigte sich in hypoxischen A549-Zellen für beide Proteine im Vergleich zur (un-)bestrahlten, normoxischen Kontrolle eine Konzentrationssteigerung. Folglich zeigte sich unabhängig von der Bestrahlung sowohl für HIF-1 $\alpha$  (etwa 7-fach) als auch für GLUT-1 (ca. 2,5-fach) eine Konzentrationssteigerung durch Hypoxie. Die Konzentration von GLUT-1 und HIF-1 $\alpha$  blieb in reoxygenierten A549-Zellen unverändert.

Nach Schwerionenbestrahlung ließ sich zwischen den bestrahlten und den nichtbestrahlten Kontrollgruppen kein Unterschied bezüglich der Konzentration von HIF-1 $\alpha$  und GLUT-1 feststellen (Abb. 47).



**Abbildung 47: HIF-1α- und GLUT-1-Aktivierung in Western Blot und Densitometrie bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt**

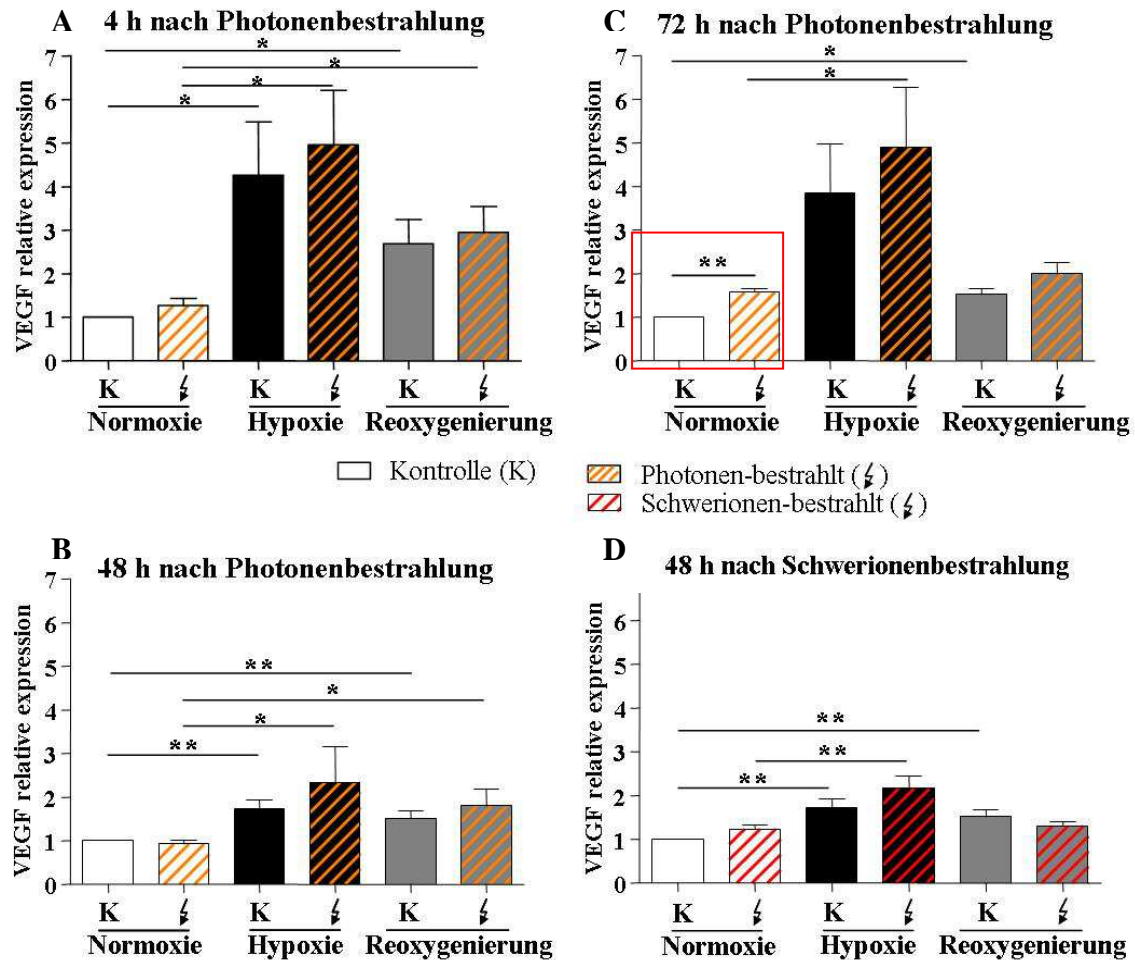
Erhöhte HIF-1α- und GLUT-1-Konzentration durch Hypoxie in Schwerionen bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Keine erhöhte Proteinkonzentration durch Schwerionenbestrahlung. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Außerdem wurde die Proteinexpression von sekretiertem VEGF-A und SCF in Zellkulturüberständen der behandelten A549-Zellen quantitativ im ELISA untersucht.

Für VEGF wurde 24, 48 h und 72 h nach Photonenbestrahlung sowohl unter Hypoxie als auch unter Reoxygenierung bei den bestrahlten und bei den nicht-bestrahlten Zellen eine wesentlich vermehrte Konzentration gemessen. Hypoxische und reoxygenierte A549-Zellen zeigten somit unabhängig von der Bestrahlung eine erhöhte VEGF-Sekretion (Abb. 48).

Eine gesteigerte VEGF-Konzentration durch Photonenbestrahlung zeigte sich nach 72 h in normoxischen A549-Zellen. Hier bewirkte die Photonenbestrahlung eine relative Expressionssteigerung von VEGF im Mittel um den Faktor 1,56. Schwerionenbestrahlung veränderte die VEGF-Konzentration zu keinem Zeitpunkt in keiner der unterschiedlich oxygenierten Vergleichsgruppen.





**Abbildung 48 ELISA: VEGF-Expression bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung**

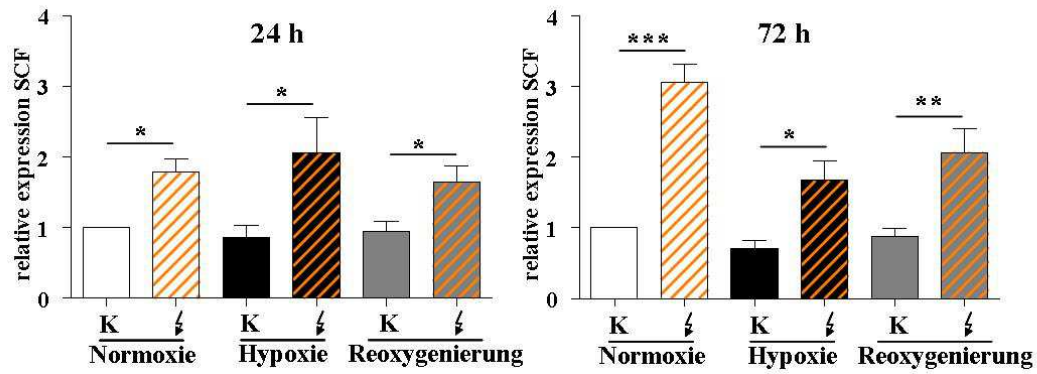
A,B: 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung und in der Kontrollgruppe Anstieg von VEGF durch Hypoxie und Reoxygenierung (Sauerstoffeffekt).

C: 72 h nach Photonenbestrahlung durch die Bestrahlung in der Normoxiegruppe Anstieg von VEGF, ebenfalls durch Reoxygenierung in der Kontrollgruppe und Hypoxie nach Photonenbestrahlung.

D: 48 h nach Schwerionenbestrahlung keine Unterschiede durch Bestrahlung. Anstieg von VEGF durch Hypoxie in bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Vermehrte VEGF-Sekretion in reoxygenierten, unbestrahlten A549-Zellen.

Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem bzw. ungepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Es zeigte sich unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Zellen durch die Photonenbestrahlung eine vermehrte Proteinexpression von SCF (Abb. 49). Änderungen des Sauerstoffgehalts der Zellen verursachten keine Änderungen in der Proteinexpression von SCF.



**Abbildung 49 ELISA: SCF-Expression bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt 24 h und 72 h nach Photonenbestrahlung**

24 und 72 h nach Photonenbestrahlung Anstieg von SCF durch Bestrahlung in allen Sauerstoffzuständen. Bei der statistischen Auswertung mittels gepaartem bzw. ungepaartem T-Test wurden die Signifikanzniveaus mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  oder \*\*\*  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

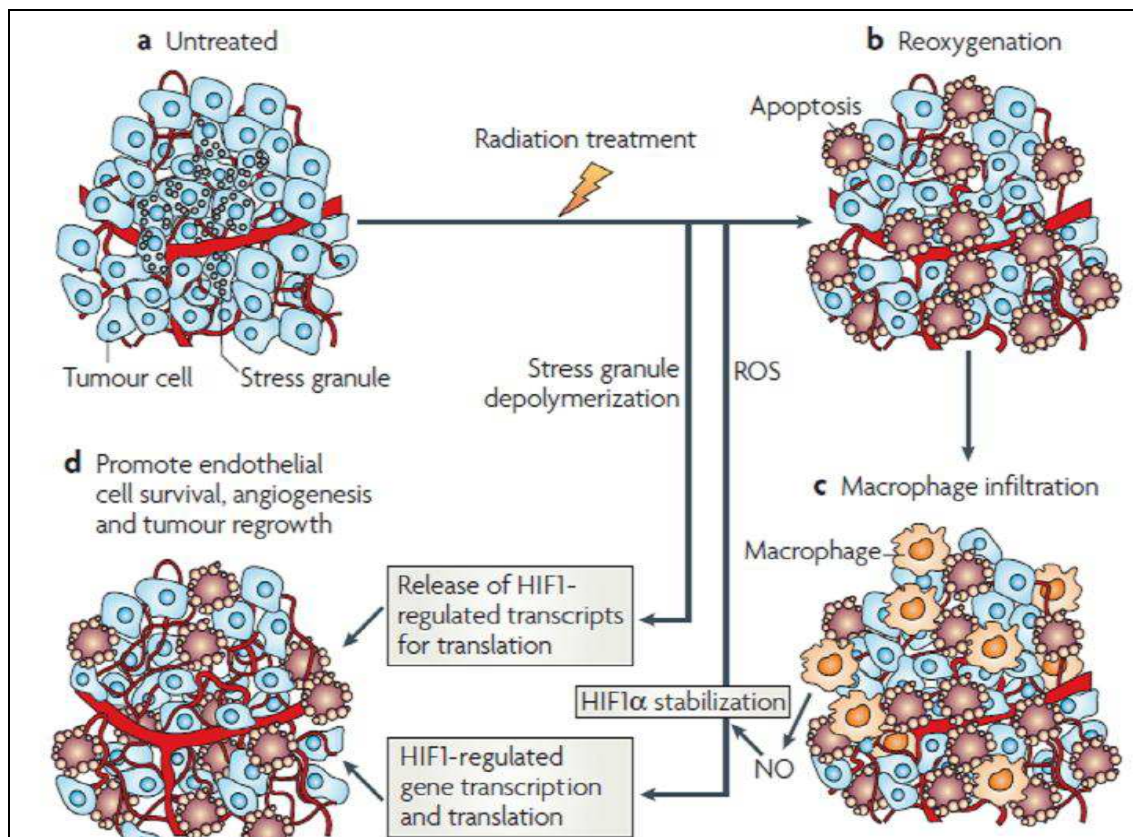
## 4. Diskussion

Aus der Literatur war bekannt, dass Zellen in hypoxischen Tumorearealen besonders unsensibel für Photonenbestrahlung sind (Brizel, Sibley, Prosnitz, Scher, & Dewhirst, 1997). *In vivo* konnte an einem Mausmodell eine gesteigerte Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1) in Brustkrebszellen (4T1) nach Photonenbestrahlung gezeigt werden (Moeller et al., 2004). HIF-1 scheint einen wesentlichen Anteil an der beschriebenen Radioresistenz gegenüber Photonen zu tragen (Harada & Hiraoka, 2010). Die Rolle von HIF-1 nach Schwerionenbestrahlung war noch nicht untersucht. Das Ziel meiner Arbeit war es im ersten Schritt ein Modell zu entwickeln, anhand dessen im zweiten Schritt die Funktionsweise von HIF-1 und dessen Zielgenen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen nach Schwerionenbestrahlung vergleichend zur Photonenbestrahlung zu untersuchen.

### ***4.1 Gewählte Methode zur Induktion von Hypoxie und Reoxygenierung führt zu einer gesteigerten Expression HIF-1-abhängiger Zielgene***

Zunächst habe ich in meiner Arbeit analysiert, ob sich unter gegebenem Versuchsaufbau, die Verhältnisse hypoxischer Areale in Tumoren nachstellen lassen. 4 h, 24 h und 48 h nach Versuchsbeginn hatte sich durch Hypoxie eine signifikante Mehrexpression der HIF-1-abhängigen Zielgene: Glukose-1-Transporter (GLUT-1), Lactatdehydrogenase-A (LDHA), Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1) und Vascular endothelium growth factor (VEGF) gezeigt (Abb. 7). Die erhöhte Aktivität von HIF-1 und dessen Zielgenen unter hypoxischen Bedingungen ist heute etabliert (Firth, Ebert, Pugh, & Ratcliffe, 1994; G. Semenza, 1992; G. L. Wang & Semenza, 1993). Wichtig war allerdings *in vitro* ein Modell zu entwickeln, um daran die Rolle von HIF-1 nach Bestrahlung besser untersuchen und verstehen zu können. Die Bedeutung der Reoxygenierung für die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Radioresistenz wurde durch Moeller et al. 2004 *in vivo* gezeigt (Moeller et al., 2004). Photonenbestrahlung bewirkt durch Absterben vor allem der gut oxygenierten Zellen eine Reoxygenierung des hypoxischen Tumorgewebes. Somit werden einerseits durch die Bestrahlung freie Radikale (ROS) gebildet (Hammond, Dorie, & Giaccia, 2003), die dann wiederum

HIF-1 $\alpha$  stabilisieren. Andererseits komme es durch Reoxygenierung zu einer Depolymerisation von sogenannten „Stressgranula“, die HIF-1 mRNA enthalten und freilassen, sodass diese zur Translation zur Verfügung stehen. Außerdem kommt es durch das Absterben gut oxygenierter Tumorzellen zu einem Einwandern von Macrophagen, die über NO HIF-1 $\alpha$  stabilisieren (Moeller et al., 2004) (Abb. 50).



**Abbildung 50: HIF-1-Regulation nach Photonenbestrahlung**

Dewhirst MW.: Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response.

In: Nat Rev Cancer (2008)

In meiner Arbeit konnte eine signifikante Steigerung HIF-1-abhängigen Zielgene (GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF) durch Reoxygenierung 4 h nach Versuchsbeginn gezeigt werden (Abb. 8). An den später untersuchten Zeitpunkten konnte jedoch kein Unterschied zu normoxischen Zellen mehr festgestellt werden. Es scheint, dass nach 24 h in normoxischer Umgebung Adaptationsmechanismen bereits eingeleitet sind und man daher keine Expressionsunterschiede erkennen kann. Moeller et al. konnten einerseits eine vermehrte HIF-1-Aktivität in murinen Mammakarzinomzellen (4T1) nach Zugabe von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) nachweisen, zeigten aber auch, dass diese Aktivität durch die Superoxid Dismutase (SOD) komplett unterdrückt wird (Moeller et

al., 2004). Die zelleigene SOD könnte also dafür verantwortlich sein, dass sich nach 24 h und 48 h durch Reoxygenierung keine Unterschiede in der Expression HIF-1-abhängiger Gene mehr feststellen lassen. Insbesondere, weil in Tumorgewebe ein ständiger Wechsel hypoxischer und normoxischer Areale stattfindet (Mark W Dewhirst, Cao & Moeller, 2008), ist der Zeitpunkt der Untersuchungen entscheidend.

Der als Zellzykluskontrolleur erwartungsgemäß nach Bestrahlung vermehrt exprimierte Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1A (CDKN1A) (s. Abb. 11) zeigte in unseren Versuchen auch eine dezente sauerstoffabhängige Regulation: An allen drei untersuchten Zeitpunkten wurde CDKN1A mRNA durch Hypoxie (Mittelwert des  $-\Delta\Delta C_T$  0,9) und nach 4 h durch Reoxygenierung (Mittelwert des  $-\Delta\Delta C_T$  0,9) vermehrt exprimiert (Abb. 7 und 8). Im Vergleich zu den HIF-1-abhängigen Zielgenen war dieser Effekt zwar relativ schwach ausgeprägt, aber kontinuierlich feststellbar. Immerhin konnte in etwa eine Verdopplung der CDKN1A mRNA hypoxischer bzw. reoxygenierter Zellen gegenüber normoxischer Zellen nachgewiesen werden. Da sich diese Verdopplung an allen drei untersuchten Zeitpunkten darstellte, scheint die sauerstoffabhängige Regulation von CDKN1A trotz jeweils relativ schwachem Effekt insgesamt von Bedeutung zu sein. Auch Wang et al. und Yoshida et al. konnten eine sauerstoffabhängige Regulation von CDKN1A auf mRNA- und Proteinebene bei Kardiomyozyten der Ratte (H9C2) bzw. Plattenepithelkarzinomzellen im Kopf-Hals-Bereich (OSCC) beobachten (Wang D, Zhang YZ, Yang B, Zhang FX, Cao MY, Wang C, 2011; Yoshida et al., 2009). Reoxygenierung stellte sich dabei als schwächerer Stimulus dar. Wang et al. gehen von einer Induktion des CDKN1A aufgrund dessen Funktion bei der DNA-Reparatur aus und vermuten, dass eine vermehrte Expression von CDKN1A zu einer vorzeitigen Zellalterung führt. Weiterhin sehen Goda et al. einen Zusammenhang zwischen Hypoxie, HIF-1 und CDKN1A in murinen Fibroblasten und B-Lymphozyten. In hypoxischen Bedingungen sei HIF-1 dabei Initiator des u.a. über CDKN1A vermittelten Zellzyklusarrests (Goda, Ryan, & Khadivi, 2003). Die hier gezeigte Sauerstoffabhängigkeit von CDKN1A und dessen den HIF-1-abhängigen Zielgenen ähnliches Verhalten stehen mit dieser Hypothese im Einklang.

Weder der Stammzellfaktor (SCF) noch Thioredoxin-1 (Trx-1) wurde in seiner Expression durch veränderten Sauerstoffgehalt in der Umgebung beeinflusst (Abb. 7 und 8). Demgegenüber konnten in Großhirnrindenzellen der Maus nach 24 stündiger Hypoxie und in einigen weiteren Zelllinien (MCF-7, MDA-MB231 (beide Mammakarzinomzelllinien), KB (Ovarialkarzinomzelllinie) und A549) nach einer

Hypoxiedauer von 6 und 12 h gesteigerte SCF Protein- und mRNA-Level gezeigt werden (Han et al., 2008; Jin, Mao, Sun, & Xie, 2002). In beiden Studien wurden allerdings Proteine und mRNA unmittelbar im Anschluss an die Hypoxie extrahiert - in meiner Arbeit erst nach 4, 24 oder 48 h nach zuvor 24-stündiger Hypoxie (also insgesamt 28 h, 48 h oder 72 h). Demnach könnte der Zeitpunkt der Protein- und mRNA-Untersuchungen ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass SCF unmittelbar nach Hypoxie-Exposition vermehrt aktiviert wird, dann aber relativ schnell wieder auf das ursprüngliche Level zurückgeht. Zudem war die Hypoxiedauer in den genannten Studien kürzer. Auch Han et al. konnten zeigen, dass bei einer längeren Hypoxiedauer (48 h) die Hypoxie-induzierte SCF-Expression vermindert war (Han et al., 2008).

In der Literatur wird eine HIF-1 $\alpha$ -Induktion *in vitro* durch exogen erhöhte Trx-1-Level in einigen Zelllinien beschrieben (Ema et al., 1999; Welsh et al., 2002). Weniger untersucht sind allerdings die genauen Umstände unter denen Trx-1 in der Zelle vermehrt exprimiert wird. Malec et al. zeigten 2010, dass Trx-1 als Zielgen des Transkriptionsfaktors Nrf-2 (engl. nuclear factor erythroid 2-related factor) nach intermittierender Hypoxie vermehrt exprimiert wird und so zu einer gesteigerten HIF-1 $\alpha$ -Aktivität führt (Malec, Gottschald, Li, & Rose, 2010). In dieser Studie wurden verschiedene Arten der Hypoxie bzw. Reoxygenierung und deren Einfluss auf Trx-1 untersucht. Nur durch den wiederholten Wechsel zwischen Hypoxie und Normoxie wurde ein signifikanter Anstieg der Trx-1 mRNA im Vergleich zur Normoxie festgestellt. Einmalige Hypoxie hatten keinen Effekt verursacht, sodass die Ergebnisse im Einklang mit dieser Arbeit stehen: Reoxygenierung in unserem Versuchsaufbau bedeutet eine einmalige Phase unter Hypoxie über 24 h gefolgt von normoxischen Bedingungen. Es ist anzunehmen, dass dieser Stimulus nicht ausreichend ist, um eine deutlich vermehrte Trx-1-Aktivität wahrzunehmen.

Insgesamt wurden unter dem verwendeten Versuchsaufbau die HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF 4, 24 und 48 h nach Versuchsbeginn durch Hypoxie und 4 h nach Versuchsbeginn durch Reoxygenierung vermehrt exprimiert. Daher konnte mit dieser Methode die Induktion von HIF-1-abhängigen Zielgenen in A549-Zellen erreicht werden und die gewählte Methode stellte sich als geeignet für die folgenden Untersuchungen zur Photonen- bzw. Schwerionenbestrahlung dar.

#### ***4.2 Erhöhtes zelluläres Überleben hypoxischer Zellen nach Photonenbestrahlung im Gegensatz zur Schwerionenbestrahlung***

Zellzählung und Koloniebildungstest zeigten, dass sowohl Photonenbestrahlung als auch Schwerionenbestrahlung zu einem signifikant geringeren Überleben der A549-Zellen nach 24 h, 72 h und 7 bzw. 10 Tagen geführt hatte. Diese dosisabhängige Abnahme des zellulären Überlebens, sowie die höhere biologische Wirksamkeit von Schwerionen gegenüber Photonen stehen im Einklang mit der Literatur (Curtis et al., 1984; Tobias et al., 1982). Außerdem überlebten 24 h nach Versuchsbeginn unter den nicht bestrahlten Zellen wesentlich weniger hypoxische Zellen als die in Normoxie belassenen Zellen (Abb. 9, 10). Dies belegt den Stress den Hypoxie auf Zellen auswirkt und steht ebenfalls im Einklang mit der Literatur (Powell, Wright, & Jackson, 2004). Zu späteren Zeitpunkten schienen die Zellen wieder adaptiert, sodass kein Unterschied mehr festzustellen war. Für die hier gestellte Fragestellung war jedoch das Verhalten der unter verschiedenen Sauerstoffzuständen bestrahlten Zellen von besonderem Interesse. Hier zeigte sich nach 7 Tagen in der Zellzählung und nach 10 Tagen im Koloniebildungstest ein signifikant erhöhtes Überleben nach Photonenbestrahlung hypoxischer Tumorzellen im Vergleich zu normoxischen Zellen. Dieser Effekt war unter Schwerionenbestrahlung nicht zu beobachten (Abb. 9). Folglich weisen Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine höhere Resistenz gegen Photonenbestrahlung auf, was ebenfalls im Einklang mit der Literatur steht (Brizel et al., 1997; Gray et al., 1953; Harris, 2002; Palcic & Skarsgard, 1972; Thomlinson & Gray, 1955). Auf das zelluläre Überleben nach Schwerionenbestrahlung hat der Sauerstoffzustand der bestrahlten Zellen jedoch keinen wesentlichen Einfluss. Dies lässt sich dadurch begründen, dass Schwerionenbestrahlung einen höheren LET (hier 70 keV/μm) hat. In der Literatur ist beschrieben, dass ionisierender Strahlung mit einem höheren LET durch ein niedrigeres OER in seiner Wirkung weniger vom Vorhandensein von Sauerstoff abhängig ist (K. Ando et al., 1999; Chapman, Urtasun, Blakely, Smith, & Tobias, 1978; M. R. Raju, 1980; Wambersie et al., 2004). Neben dieser bekannten Begründung könnten weitere bis jetzt noch nicht bekannte Faktoren (beispielsweise eine unterschiedliche Aktivierung von HIF-1, s.u.) Einfluss auf die differierende Abhängigkeit der beiden Bestrahlungsarten vom Sauerstoffgehalt der Zellen nehmen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gezeigten Daten zum zellulären und klonogenen Überleben im Einklang mit der Literatur stehen und sich ein niedriger

Sauerstoffverstärkungsfaktor bei der Schwerionenbestrahlung mit Kohlenstoffionen vermuten lässt. Ob HIF-1 eine Rolle auf die Strahlensensibilität der Zellen hat, sollte daher anhand von Genexpressions- und Proteinanalysen unter dem gewählten Versuchsaufbau näher untersucht werden.

#### ***4.3 Induktion HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie bzw. Reoxygenierung ist in bestrahlten und nicht-bestrahlten A549-Zellen vergleichbar***

Die Stabilisierung der  $\alpha$ -Untereinheit und damit die Aktivierung von HIF-1 durch Hypoxie ist etabliert (G. Semenza, 1992). Ebenso wird, seitdem Moeller et al. *in vivo* eine verstärkte HIF-1-Aktivierung nach Photonenbestrahlung dargelegt haben (Moeller et al., 2004), vermutet, dass HIF-1-abhängige Zielgene durch Photonenbestrahlung gesteigert exprimiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Trotzdem kann nicht ohne Weiteres davon ausgegangen werden, dass sich der Effekt, den Hypoxie auf unbestrahlte Zellen ausübt, in identischer Weise auf bestrahlte Zellen übertragen lässt. Dies wird insbesondere dann deutlich, wenn man bedenkt, dass Photonenbestrahlung die Sauerstoffversorgung der Tumorgewebe verändert (Koutcher, Alfieri, Devitt, & Rhee, 1992; Vaupel, Frinak, & O'Hara, 1984). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit explizit auch bestrahlte Zellen auf eine vermehrte Expression von HIF-1-abhängigen Zielgenen durch Hypoxie und Reoxygenierung (Sauerstoffeffekt) untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF auf mRNA-Ebene auch in bestrahlten Zellen (sowohl nach Photonen- als auch nach Schwerionenbestrahlung) durch Hypoxie und Reoxygenierung vermehrt aktiviert wurden (s. 3.4). Einen stärkeren Reiz stellte dabei die (während des gesamten Versuchablaufes anhaltende) Hypoxie dar. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen stellte die Tatsache dar, dass die Hypoxiegruppe auch während und nach Bestrahlung weiterhin hypoxischen Bedingungen ausgesetzt war, wohingegen die Reoxygenierungsgruppe während der Bestrahlung bis zum Versuchsende in Normoxie verblieb.

Masunaga et al. haben in ihrer Arbeit von 2009 den Einfluss von Hypoxie auf die Erholung von Zellen nach  $\gamma$ - (Cobalt-60, 2,5 Gy/Min.) und nach Kohlenstoffionenbestrahlung *in vivo* untersucht. Dabei war die weiterhin bestehende



Hypoxie nach  $\gamma$ - (Cobalt-60) nicht aber nach Kohlenstoffionenbestrahlung für die Erholung von Zellen bedeutend (Masunaga et al., 2009). Die Hypoxie wurde in dieser Arbeit 15 Minuten vor Bestrahlung durch ein Abklemmen der Tumore erzeugt und entweder beibehalten oder durch Lösen der Klemme aufgehoben. Anschließend erfolgten Untersuchungen zum klonogenen Überleben, immunhistochemischen Färbungen und Mikrokerntests (zur Darstellung von Chromosomenschäden). Hierbei erholten sich weniger Zellen, die nach  $\gamma$ -Bestrahlung weiterhin hypoxisch blieben, als Zellen, die nach Bestrahlung reoxygeniert wurden. Nach Kohlenstoffionenbestrahlung wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Dies unterstreicht, dass die Ergebnisse unbestrahlter Zellen nicht automatisch auf bestrahlte Zellen übertragen werden können und hierbei auch die Strahlenqualität beachtet werden muss.

Im Einklang mit den Ergebnissen meiner Arbeit steht zudem, dass Reoxygenierung zu frühen Zeitpunkten (hier 4 h nach Bestrahlung Einfluss auf die Expression HIF-1-abhängiger Zielgene ausübt (Abb. 26-28). Diesbezüglich stellte VEGF in unseren Untersuchungen eine Ausnahme dar: Während bei den übrigen Genen Reoxygenierung nur nach 4 h zu einer vermehrten Expression geführt hatte, wurde VEGF in den mit Photonen bestrahlten auch nach 24 h und 48 h durch Reoxygenierung verstärkt exprimiert. Da durch die Bestrahlung der Oxygenierungszustand der Tumorzellen im ständigen Wechsel ist, scheinen die Zellen sensibler auf (zusätzliche) Reoxygenierung zu reagieren. Damit könnten noch über einen längeren Zeitraum Stimuli zur Blutgefäßneubildung ausgeschüttet werden. Dies spricht dafür, dass die verstärkte Angiogenese einen wesentlichen Anteil am steigenden Sauerstoffpartialdruck nach Photonenbestrahlung trägt.

Im Gegensatz zu der Arbeit von Masunga et al., in der gezeigt wurde, dass Hypoxie auf die Erholung der mit  $\gamma$ -Strahlung behandelten Zellen im Vergleich zu denen nach Kohlenstoffionenbestrahlung einen unterschiedlichen Effekt hatte, stellte sich in meiner Arbeit ein vergleichbares Verhalten der mit Photonen sowie auch der mit Schwerionen bestrahlten Zellen dar. Lediglich CDKN1A, GLUT-1, und LDHA wurden erst 48 h nach Schwerionenbestrahlung (also zu einem späteren Zeitpunkt) durch Hypoxie vermehrt exprimiert (Abb. 32-34). Somit könnten die unterschiedlichen Ergebnisse darin begründet sein, dass Masunga et al. nur einen Zeitpunkt untersucht haben. Hypoxie bzw. Reoxygenierung könnten auch nach Kohlenstoffionenbestrahlung an einem späteren Zeitpunkt einen wesentlichen Effekt auf die Erholung der Zellen ausüben.

Ein Beleg für die zeitlich unterschiedlich auftretende Reoxygenierung von Tumorzellen nach Kohlenstoff- gegenüber Photonenbestrahlung konnten Fukawa et al. *in vivo* und Oya et al. *in vitro* erbringen. Höhepunkte des Sauerstoffpartialdrucks traten nach Photonenbestrahlung später (nach 3 Tagen) und auf die Peripherie konzentriert auf, wohingegen sie nach Kohlenstoffionenbestrahlung früher (nach einem Tag) und homogen im Tumorgewebe verteilt auftraten (Fukawa et al., 2004; Oya et al., 2001). Da also umgekehrt niedrigere Werte des Sauerstoffpartialdruckes (Hypoxie) nach Photonenbestrahlung früh und nach Kohlenstoffionenbestrahlung spät auftraten steht dies im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen. Die durch Hypoxie bedingte Mehrexpression HIF-1-abhängiger Zielgene trat in meiner Arbeit in mit Schwerionen bestrahlten Zellen später auf als in den Zellen, die mit Photonen bestrahlt wurden. Fukawa et al. und Oya et al. zeigten, dass sich sowohl nach Photonen- als auch nach Schwerionenbestrahlung die Sauerstoffverteilung in den behandelten Tumorarealen veränderte. Dabei unterschieden sich das zeitliche Auftreten besonders hoher Sauerstoffpartialdrücke und die Lokalisation (Tumorperipherie vs. Tumorzentrum) bei beiden Bestrahlungsformen (Fukawa et al., 2004; Oya et al., 2001).

Insgesamt ist demnach die vermehrte Expression HIF-1-abhängiger Zielgene in unbestrahlten und bestrahlten A549-Zellen durch Hypoxie und Reoxygenierung vergleichbar. Dabei zeigen sowohl Schwerionen- als auch Photonen-bestrahlte A549-Zellen eine vermehrte Expression HIF-1-abhängiger Zielgene durch Hypoxie und Reoxygenierung allerdings zum Teil nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

#### ***4.4 Einfluss von Schwerionen- bzw. Photonenbestrahlung auf die Genregulation***

Der Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1A übernimmt eine wichtige Kontrollfunktion im Zellzyklus. Er sorgt bei DNA-Schäden für Zellzyklusarrest und inhibiert die Replikation der geschädigten DNA (Akashi et al., 1995; Cazzalini et al., 2010; Dulić et al., 1994; Harper et al., 1993). Auch bei durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden wird CDKN1A vermehrt aktiviert. Dies gilt neben der besser untersuchten Photonenbestrahlung auch für Schwerionenbestrahlung (Fournier, Wiese, & Taucher-Scholz, 2004; Jakob, Scholz, & Taucher-Scholz, 2002; Jinno-Oue et al., 2010; A. Takahashi et al., 2000). In dieser Arbeit diente CDKN1A als Positivkontrolle für die Bestrahlung, sodass anhand seiner gesteigerten Genexpression der erfolgte

Bestrahlungseffekt dokumentiert werden sollte. Dies konnte sowohl nach Photonen- als auch nach Schwerionenbestrahlung an allen drei untersuchten Zeitpunkten gezeigt werden (Abb. 11, 18). Somit konnten die Gene, deren Verhalten nach Bestrahlung nicht bekannt ist, dahingehend genauer analysiert werden.

#### **4.4.1 Expressionssteigerung HIF-1-abhängiger Zielgene durch Photonenbestrahlung**

HIF-1 wird immer wieder in Zusammenhang mit der unter Hypoxie bzw. Reoxygenierung beobachteten Radioresistenz (siehe 4.1) gebracht (Harada & Hiraoka, 2010; Harada et al., 2012; Moeller et al., 2005, 2004). Daher sollten auch die HIF-1-abhängigen Zielgene nach Photonenbestrahlung vermehrt exprimiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF-A in normoxischen A549-Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach Photonenbestrahlung vermehrt exprimiert wurden (VEGF-A und LDHA 48 h nach Bestrahlung, PDK-1 24 und 48 h, GLUT-1 4, 24 und 48 h nach Bestrahlung, Abb. 12-15). Interessant war, dass bei diesen Genen ein Unterschied durch Bestrahlung nur in der vorher in normoxischen Bedingungen belassenen Zellen festgestellt werden konnte. Weder im Vergleich der Hypoxie- noch der Reoxygenierungsgruppen verstärkte sich signifikant messbar die relative mRNA-Expression. Eine Erklärung könnte sein, dass bereits der veränderte Sauerstoffgehalt der Zellen, HIF-1 (und somit GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF) so stark aktiviert, dass sich durch Bestrahlung keine zusätzlich messbare Steigerung mehr einstellt. Weiterhin gehen Hamada et al. von einer glukoseabhängigen Aktivierung von HIF-1 nach Bestrahlung aus (Harada et al., 2009). Der Glukosestoffwechsel könnte demnach unter Hypoxie nicht ausreichend oder nur teilweise ablaufen und so eine glukoseabhängige Aktivierung nicht ermöglichen. Dies könnte erklären, warum die mRNA in mit Photonen bestrahlten normoxischen nicht aber in bestrahlten hypoxischen bzw. reoxygenierten A549-Zellen gesteigert wird. Lund et al. konnte in humanen, hypoxischen Glioblastomzellen eine signifikante Steigerung von sekretierten VEGF nach Photonenbestrahlung mit deutlich höheren Dosen (20 Gy) zeigen (E. L. Lund et al., 2004). In Übereinstimmung mit den gezeigten Ergebnissen dieser Arbeit verstärkte sich die Expression von VEGF auf Proteinebene bei geringeren Dosen in hypoxischen Zellen nur tendenziell (Abb. 48). Im Gegensatz zu dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurde die Hypoxie durch eine Tasche, in der Sauerstoff komplett gebunden wird, erzeugt, sodass die Glioblastomzellen einer stärkeren Hypoxie ( $< 0,1\%$

Sauerstoff) ausgesetzt waren. Demnach scheinen für die Steigerung der VEGF-Expression die Dosis der Bestrahlung, die ursprüngliche Aktivität des Proteins und die Zelllinie mögliche Einflussfaktoren darzustellen, welche zu den differenten Ergebnissen führen könnten.

Weiterhin von großer Bedeutung erscheint für die einzelnen Gene außerdem der Expressionszeitpunkt: Während GLUT-1 mRNA an allen drei untersuchten Zeitpunkten nach Photonenbestrahlung hochreguliert wurde, PDK-1 mRNA nach 24 und 48 h, wurden LDHA und VEGF mRNA nur 48 h nach Bestrahlung signifikant vermehrt exprimiert (Abb. 12-15). GLUT-1, LDHA und PDK-1 wurden bereits in vielen Studien als HIF-1 Zielgen entschlüsselt (Ebert, Firth, & Ratcliffe, 1995; Kim, Tchernyshyov, Semenza, & Dang, 2006; Papandreou, Cairns, Fontana, Lim, & Denko, 2006; G. L. Semenza, 2002; G. Semenza, Roth, & Fang, 1994; G. L. Wang & Semenza, 1993). Die gesteigerte Genexpression nach Photonenbestrahlung wurde meines Wissens nach *in vitro* bisher noch nicht gezeigt.

Lund et al. hatten in humanen Glioblastomzellen in Übereinstimmung mit dieser Arbeit keine zusätzliche Steigerung von GLUT-1 in hypoxischen Zellen durch Bestrahlung gesehen (E. L. Lund et al., 2004). Da weder GLUT-1 noch HIF-1 eine verstärkte Expression zeigten, schlussfolgern die Autoren, dass die erhöhte Expression von VEGF durch Bestrahlung über einen HIF-1-unabhängigen Mechanismus induziert werden müsse. Bei meinen Experimenten zeigte sich jedoch, dass in normoxischen Zellen Photonenbestrahlung neben VEGF auch GLUT-1 mRNA, LDHA mRNA und PDK-1 mRNA als weitere HIF-1-abhängige-Zielgene steigerte. Meine Ergebnisse und die durch Moeller et al. *in vivo* und durch Lerman et al. in Endothelzellen gezeigte Induktion von HIF-1 (Lerman et al., 2010; Moeller et al., 2004) sprechen für eine durch HIF-1 vermittelte VEGF-Expressionssteigerung nach Photonenbestrahlung. Trotzdem ist ein zusätzlicher Aktivierungsmechanismus damit nicht ausgeschlossen.

Harada et al. bestätigen eine vermehrte Expression von HIF-1 24 h nach Bestrahlung *in vivo* (Harada et al., 2009). Vermittelt werde diese über die Akt/mTOR-Kaskade. Hierzu sei das Vorhandensein metabolisierbarer Glukose notwendig (s. 4.5)

Eine gesteigerte VEGF-Expression und somit die über HIF-1 verstärkte Angiogeneserate nach Photonenbestrahlung konnte durch einige Arbeitsgruppen in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden (Gorski et al., 1999; Gupta et al., 2002; Heissig et al., 2005; Lerman et al., 2010; Polytarchou, Gligoris, Kardamakis, Kotsaki, & Papadimitriou, 2004; Sonveaux et al., 2003). Gorski et al. konnten zeitabhängig bei

einer Dosis von 10 Gy *in vitro* in verschiedenen Zelllinien schon nach 24 h eine höhere VEGF-Protein-Konzentration messen (Gorski et al., 1999). In Anbetracht dieser und der hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 48) scheint die Dosiswirkungsbeziehung, mit der bestrahlt wird, auch für den Zeitpunkt einer verstärkten Expression relevant. In der Arbeit von Gorski et al. könnte die höhere Bestrahlungsdosis verantwortlich sein für den im Vergleich zu meiner Arbeit zeitlich früheren Anstieg des VEGF-Levels. Somit könnte die Dosis Einfluss auf Zeitpunkt und Stärke einer gesteigerten Expression nehmen (sodass auch in hypoxischen Zellen ein Effekt wahrzunehmen ist, s.o.). Denkbar ist, dass eine hohe Bestrahlungsdosis zu einer früheren und stärkeren Expressionssteigerung führen könnte.

Ähnlich wie in der Arbeit von Moeller et al. (Moeller et al., 2004) war es jedoch nur begrenzt möglich wesentliche Unterschiede auf Proteinebene darzustellen. Hypoxie hatte sowohl im ELISA (VEGF) als auch im Western Blot (HIF-1, GLUT-1) zu signifikant gesteigerten Proteinkonzentrationen geführt (Abb. 46-49). 72 h nach Photonenbestrahlung wurde die VEGF-Aktivität im ELISA relativ zur Kontrolle signifikant gesteigert. Demgegenüber konnten in den semiquantitativen Western Blot-Analysen und der anschließenden Densitometrie nur Tendenzen bezüglich einer gesteigerten GLUT-1 und HIF-1 Expression beobachtet werden. Eine Ursache dafür könnte eine zu einem späteren Zeitpunkt ausschlaggebende Steigerung auf Proteinebene sein. Insbesondere da sich die Expression der mRNA HIF-1-abhängiger Gene erst 48 h nach Bestrahlung signifikant gesteigert hatte und somit die entsprechenden Proteine erst mit einer gewissen Verzögerung synthetisiert werden konnten.

Seit bekannt ist, dass Tumoren ohne Angiogenese ein stark verzögertes Wachstum (Gimbrone, Leapman, & Cotran, 1972) und damit kaum klinische Relevanz zeigen, stellt VEGF als Angiogenesefaktor einen wichtigen Angriffspunkt zur Verbesserung der Radiosensibilität von Tumorzellen dar (Geng, Donnelly, McMahon, & Lin, 2001; Hess, Vuong, Hegyi, & Riesterer, 2001; E. Lund & Bastholm, 2000). Insbesondere verstärkte Angiogenese nach Photonenbestrahlung wird als Schlüsselreaktion der Tumorzellen für ausbleibende Therapieerfolge gesehen (Harada et al., 2007; Moeller et al., 2004). Allerdings wird neben VEGF auch SCF, dessen Funktion bei der Stammzelldifferenzierung als Zytokin besser bekannt ist, eine wichtige Rolle als Angiogenesefaktor zugeordnet (Sun et al., 2006; W. Zhang et al., 2000). Daher wurden hier VEGF und SCF als wichtige Angiogenesefaktoren im ELISA näher untersucht. In

den Genexpressionsanalysen hatte sich der Zeitpunkt der Untersuchungen als wichtiger Einflussfaktor herausgestellt, sodass durch den ELISA aus Zellkulturüberständen nun der kumulative Effekt über die gesamte Zeitspanne, den die Mehrexpression des jeweiligen Gens auf die Zellen ausübt, näher erläutert werden sollte. Auch auf Proteinebene war Hypoxie bzw. Reoxygenierung für VEGF und Photonenbestrahlung für SCF der stärkere Stimulus, wobei VEGF nach 72 h ebenfalls durch Photonenbestrahlung signifikant vermehrt aktiviert wurde. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Kamlah et al., 2011) konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass SCF mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung vermehrt exprimiert wird. SCF wurde durch Hypoxie hingegen nicht wesentlich beeinflusst. Somit könnte auch SCF für die erhöhte Angiogeneserate nach Photonenbestrahlung verantwortlich sein. Da beide Faktoren nur durch Photonenbestrahlung in ihrer Konzentration gesteigert wurden und verstärkte Angiogenese mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Lau et al., 2007; Zetter, 1998; Zhong et al., 1999), spricht das für ein verbessertes Therapieansprechen nach Schwerionenbestrahlung. Daher ist es außerdem nicht verwunderlich, dass die alleinige VEGF-Rezeptor-Blockade die Strahlensensibilität nicht so effektiv erhöht wie die Blockade der Gruppe von Tyrosinkinaserzeptoren (Laird, Vajkoczy, Shawver, & Thurnher, 2000; Ning, Laird, Cherrington, & Knox, 2002), die auch den c-Kit-Rezeptor von SCF einschließt (Smolich, 2001).

Weiterhin ist noch unklar wie HIF-1 und SCF interagieren. Während einerseits eine Induktion von HIF-1 in Pankreaskarzinom-, Leukämie- (THP-1), kleinzelligen Bronchialkarzinom- und hämatopoetischen Zellen durch SCF in Normoxie geschildert wird (Gibbs, Yasinska, Oniku, & Sumbayev, 2011; Litz & Krystal, 2006; Pedersen et al., 2008; M. Zhang et al., 2011), legen Han et al. *in vivo* eine vermehrte Expression von SCF durch HIF-1 dar. Han et al. gehen davon aus, dass HIF-1 an das HRE-Element von SCF bindet und somit zu einer gesteigerten SCF-Expression führt (Han et al., 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass SCF durch Hypoxie oder Reoxygenierung kaum beeinflussbar war, während dies für bekannte HIF-1-abhängige Zielgene gezeigt werden konnte, können die Induktion von SCF durch HIF-1 in A549-Zellen *in vitro* an den untersuchten Zeitpunkten für A549-Zellen nicht bestätigen. Es stellte sich kein Zusammenhang zwischen dem Oxygenierungszustand der A549-Zellen und der SCF-Expression dar. Trotzdem könnte HIF-1 und SCF interagieren, allerdings insofern, dass SCF, wenn es an seinen Rezeptor cKit bindet, eine vermehrte HIF-1-Induktion vermittelt. Levina et al. zeigten *in vitro*, dass A549-Zellen im Gegensatz zu ihren

undifferenzierten Tumorstammzellen deutlich weniger bis keinen cKit-Rezeptor tragen (Levina, Marrangoni, Wang, & Loop, 2010). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie A549 ließ sich im Einklang zu der Arbeit von Levina et al. auch in vorigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe keine cKit-Expression nachweisen (Kamlah et al., 2011). A549-Zellen könnten möglicherweise im Rahmen ihrer Differenzierung von Tumorstammzellen zu Tumorzellen ihren cKit-Rezeptor verlieren.

Des Weiteren konnte nach Blockade der cKit-SCF-Achse mittels SCF-neutralisierenden Antikörpern oder Imatinib eine verminderte Proliferation der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Stammzellen beobachtet werden (Levina et al., 2010). Sollten A549-Zellen kein cKit exprimieren, könnte auch eine Interaktion über cKit nicht stattfinden und somit SCF *in vitro* nicht HIF-1 induzieren. *In vivo* wären jedoch auch Tumorstammzellen vorhanden, die noch cKit exprimieren und bei denen somit über SCF HIF-1 vermittelte Resistenzmechanismen ausgelöst werden könnten. Weiterführend könnten Untersuchungen an sicher cKIT exprimierenden Zelllinien und *in vivo* Untersuchungen sein.

SCF zeigte nach Photonenbestrahlung im Vergleich zur Schwerionenbestrahlung ein komplett unterschiedliches Verhalten, nur durch Photonenbestrahlung wurde seine Genexpression erhöht. Wenn SCF mitursächlich an verstärkter Angiogenese beteiligt ist, könnte er somit auch an einem verringerten Therapieerfolg beteiligt sein. 2012 wurde zudem eine Assoziation von erhöhter Metastasierungsneigung und dem vom Tumorgewebe sezerniertem SCF bzw. cKit-positiven Zellen beobachtet (Kuonen, Laurent, & Secondini, 2012). Angenommen SCF würde HIF-1-unabhängig reguliert, würden Therapien, die beispielsweise aus einer Kombination aus Photonenbestrahlung und HIF-1-Inhibition wirken, nicht alle Hindernisse eines guten Therapieerfolgs überwinden. Zwar könnten damit dem über HIF-1-vermittelten zellulären Adaptationsmechanismen entgegengewirkt werden, andere Aktivierungskaskaden würden allerdings nicht inhibiert. Da SCF also (evtl. auch HIF-1-unabhängig) durch Photonenbestrahlung vermehrt exprimiert wurde, könnte diese mit der Anwendung von Schwerionenbestrahlung umgangen werden und damit zu einer besseren Prognose führen.

In verschiedenen malignen Tumoren, darunter Bronchialkarzinome, wurden erhöhte Trx-1-Level beobachtet (Berggren et al., 1996; Lincoln, Ali Emadi, Tonissen, & Clarke, 2003; Powis, Kirkpatrick, Angulo, & Baker, 1998). Diese erhöhten Trx-1-Level werden mit einer HIF-1 $\alpha$ -Induktion auf Proteinebene und einer schlechten Prognose durch

verringerte Apoptose und vermehrtes Zellwachstum in Zusammenhang gebracht (Ema et al., 1999; Lincoln et al., 2003; Powis, Mustacich, & Coon, 2000; Raffel et al., 2003; Welsh et al., 2002). Zum Einen ist bekannt, dass in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen erhöhter oxidativer Stress vorherrscht (Aykin-Burns, Ahmad, Zhu, Oberley, & Spitz, 2009), und zum Anderen, dass ein wichtiger Effekt von Bestrahlung auf Gewebe über die Bildung von Radikalen ausgeübt wird (Wallace, 1998). Beides legt nahe, dass Trx-1 als Oxidoreduktase eine wichtige Rolle in der Therapieresistenz von Tumorzellen spielt.

In Bezug auf Chemotherapie zeigen diverse Studien eine erhöhte Resistenz durch vermehrte Trx-1-Expression (C. Li et al., 2012; J. Wang et al., 1997; Wangpaichitr et al., 2012; Yamada, Tomida, & Yoshikawa, 1996). Nach Bestrahlung konnte die vermehrte Expression antioxidativer Enzyme in humanen Glioblastomzellen (U251) nachgewiesen werden (Lee et al., 2004). Beim Mammakarzinom wurde zudem ein Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität der Thioredoxin-Familie (insbesondere Peroxiredoxin-1) und erhöhter Rezidivneigung nach Bestrahlung gezeigt (Woolston, Storr, Ellis, Morgan, & Martin, 2011). Die Resistenz gegen  $\gamma$ -Strahlung schien durch erhöhte Trx-1-Expression in maligne transformierten broncho-epithelialen Zellen verstärkt zu sein (Demizu, Sasaki, & Trachootham, 2008). Dabei wurde die direkte Aktivierung von Trx-1 durch Bestrahlung jedoch nicht gezeigt. In den Versuchen meiner Arbeit änderten sich die Trx-1-Level in A549-Zellen weder nach einmaliger Photonenbestrahlung mit 6 Gy noch nach Hypoxie, obwohl Trx-1 unter allen Bedingungen im Vergleich zum Referenzgen stark exprimiert wurde. Auch das Zusammenwirken beider Faktoren änderte die Trx-1-Level nicht (Abb. 45). Die dauerhaft erhöhte Expression könnte als Schutzmechanismus schon unter Normoxie vorhanden sein, um oxidativen Stress direkt abzufangen. Tumorzellen könnten sich der eventuell in nicht entarteten Zellen stattfindenden Regulation entziehen. Zudem war der späteste hier untersuchte Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung; McDonald et al. konnten allerdings im Oktober 2010 zeigen, dass erst 5 Tage nach Photonenbestrahlung Nrf2, der als Transkriptionsfaktor Trx-1 aktiviert, in einigen Zelllinien vermehrt exprimiert wurde (McDonald et al., 2010). Dass Trx-1 direkt durch Photonenbestrahlung gesteigert wird, konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden, sodass sich hier ein sehr komplexer Aktivierungsmechanismus vermuten lässt.

Die vermehrte Expression von HIF-1 $\alpha$  durch Trx-1 wurde bis jetzt nur für exogen mit Trx-1-transfizierten Zellen und nur auf Proteinebene gezeigt (Welsh et al., 2002). Die



mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  hatte sich durch die Trx-1-Transfektion dabei nicht verändert. Gegen eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  durch Trx-1 nach Bestrahlung spricht die Diskrepanz zwischen spätem Auftreten des Trx-1 aktivierenden Transkriptionsfaktors Nrf2 (5 Tage nach Bestrahlung) (McDonald et al., 2010) und dem relativ dazu frühen Aktivitätshöhepunkt von HIF-1 48 h nach Bestrahlung (Moeller et al., 2004). Die einzige Möglichkeit, dass Trx-1 HIF-1 aktiviert, wäre ein noch unbekannter früher Aktivierungsmechanismus von Trx-1. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ergaben sich dafür allerdings keine Anhaltspunkte. Auf Genexpressionsebene gibt es Hinweise, dass erst der wiederholte oxidative Stress durch intermittierende Hypoxie zu einem weiteren Anstieg der Trx-1 mRNA führt (Malec et al., 2010). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass einmalige Hypoxie in A549-Zellen keinen ausreichenden Stimulus darstellt, die Trx-1-Expression weiter zu steigern. Dennoch spricht dies nicht gegen Trx-1 als Angriffspunkt bei Verbesserung der Tumorthherapie; Vielmehr scheint nur die Rolle von Trx-1 nach einmaliger Bestrahlung oder Hypoxie untergeordnet zu sein.

Insgesamt konnte eine milde Steigerung der Expression HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF durch Photonenbestrahlung in normoxischen A549-Zellen gezeigt werden. Insbesondere 48 h nach Photonenbestrahlung stellte sich für jedes dieser Gene gesteigerte mRNA-Level dar. Folglich könnten neben den in Tumorgewebe vermehrt vorkommenden hypoxischen Zellen (Vaupel, Kallinowski, & Okunieff, 1989) auch nach Photonenbestrahlung normoxische A549-Zellen HIF-1 verstärkt exprimieren. Dies könnte zu einem schlechteren Ansprechen auf eine Therapie mit Photonen beitragen. Andererseits könnte darin auch ein Angriffspunkt zur Therapieoptimierung beispielsweise mittels HIF-1-Inhibition liegen.

#### **4.4.2 Schwerionenbestrahlung führt zu keiner Änderung der HIF-1-abhängigen Zielgenexpression**

Das zelluläre Überleben der A549-Zellen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen unterschied sich nach Photonen- und nach Schwerionenbestrahlung. Während nach Photonenbestrahlung unter Hypoxie deutlich mehr Tumorzellen überlebt hatten, hatte der Oxygenierungszustand keinen Einfluss auf das Überleben nach Schwerionenbestrahlung. In dieser Arbeit wurde keines der untersuchten HIF-1-abhängigen Zielgene durch Schwerionenbestrahlung vermehrt exprimiert - im Gegensatz zur Photonenbestrahlung (Abb. 19-22). Auch auf Proteinebene blieb die

Expression von HIF-1, GLUT-1, VEGF und SCF in allen Sauerstoffzuständen nach Schwerionenbestrahlung unverändert (Abb. 46-49).

Ando et al. zeigten jedoch eine vermehrte Expression von VEGF nach Bestrahlung von humanen Plattenepithelkarzinomzellen der Lunge (RERF-LC-A1) mit Kohlenstoffionen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (S. Ando et al., 2000). Diese Hochregulation war dosisabhängig und trat bei einer Dosis von 15 Gy auf. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu meiner Arbeit lag darin, dass mit LETs von 13.3, 50 und 90 keV/μm bei der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen nicht biologisch äquivalente Dosen verwendet wurden. Zum Einen könnten also verschiedene Zelllinien unterschiedlich in ihrer VEGF-Expression nach Schwerionenbestrahlung reagieren, zum Anderen scheint erneut die Dosis und der LET einen wichtigen Einflussfaktor darzustellen: Auch wenn prinzipiell die Möglichkeit besteht, dass Schwerionenbestrahlung zu einer gesteigerten Expression führen könnte, würde dies vermutlich erst nach einer wesentlich höheren Dosis erfolgen.

Im Gegensatz dazu und im Einklang mit meinen Ergebnissen stehen eine Vielzahl anderer Arbeiten, die belegen, dass nach Kohlenstoffionenbestrahlung im Vergleich zur Photonenbestrahlung proangiogenetische Proteine und Enzyme und damit die Angiogeneserate reduziert waren (Goetze, Scholz, Taucher-Scholz, & Mueller-Klieser, 2007; Kamlah et al., 2011; Ogata, Teshima, Kagawa, & Hishikawa, 2005; Y. Takahashi et al., 2003). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Girdhani et al. konnte nach Protonenbestrahlung sogar eine verminderte Expression von VEGF und HIF-1α in A549-Zellen nachgewiesen werden (Girdhani, Lamont, Hahnfeldt, Abdollahi, & Hlatky, 2012). Damit wird eine geringere Metastasierungstendenz von Adenokarzinomen der Lunge nach Kohlenstoffionenbestrahlung verbunden (Akino et al., 2009). Zusammengenommen spricht dies gegen eine verstärkte Expression von VEGF nach Schwerionenbestrahlung und steht somit im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen.

Bis zum aktuellen Zeitpunkt gibt es meines Wissens nach keine Untersuchungen zur Expression der für die Glykolyse bedeutsamen Gene LDHA, GLUT-1 und PDK-1 nach Schwerionenbestrahlung, obwohl der sogenannte Warburg-Effekt (dass Tumorzellen auch unter Anwesenheit von Sauerstoff den Hauptteil der benötigten Energie über Glykolyse gewinnen (Warburg, 1956) und dessen Bedeutung für die Tumorbologie lange bekannt sind. Hier stellte sich heraus, dass LDHA, GLUT-1 und PDK-1 mRNA nach Photonenbestrahlung - nicht aber nach Schwerionenbestrahlung vermehrt aktiviert

wurden. Dies spricht dafür, dass Zellen unterschiedlich in ihrer Genexpression auf Schwerionen- und Photonenbestrahlung reagieren.

Das antioxidativ wirkende Trx-1 wurde weder durch Photonen- noch durch Schwerionenbestrahlung bis zu dem Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung in seiner Expression verändert (Abb. 17, 24). Zwar könnte somit auch nach Schwerionenbestrahlung die Trx-1-Aktivität an einem ähnlich späten Zeitpunkt verändert sein, erscheint aber aufgrund des Verhaltens der restlichen untersuchten Gene nicht sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigte sich sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zu keinem der untersuchten Zeitpunkte und in keiner der verglichenen Sauerstoffgruppen eine vermehrte Expression der HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF nach Schwerionenbestrahlung. Hierin kristallisiert sich ein weiterer wesentlicher Unterschied zur Photonenbestrahlung heraus. Demnach könnte mit der Nutzung der Schwerionenbestrahlung eine Aktivierung von HIF-1 und damit dessen Zielgene umgangen werden. Dies könnte insbesondere auf die Metastasierung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen einen großen Einfluss nehmen. Außerdem könnte somit HIF-1, der für die Photonenbestrahlung als Resistenzfaktor beschrieben ist, für Schwerionenbestrahlung unter Therapiebedingungen keine derartige Rolle spielen (Vgl. 4.3.1).

#### ***4.5 Synergistische Wirkung von Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Bestrahlung auf HIF-1-abhängige Zielgenexpression***

In diesem Teil der Arbeit sollte dargestellt werden, wie sich Zellen, die unter Hypoxie oder Reoxygenierung bestrahlt wurden, gegenüber Zellen die weder bestrahlt noch einem Sauerstoffmangel ausgesetzt wurden, verhalten. Ziel war, nachdem die jeweils einzelnen Effekte untersucht wurden, nun zu verstehen, was genau bei Zellen, die unter Hypoxie oder Reoxygenierung bestrahlt wurden, passiert. Zu klären war, ob Sauerstoff- und Bestrahlungseffekt synergistisch wirken oder sich eher aufheben und inwiefern sich der Mechanismus durch unterschiedliche Strahlenqualitäten beeinflussen lässt. Auf mRNA-Ebene ließen sich die untersuchten Gene hinsichtlich ihrer Induktion in 3 Gruppen einteilen. Während VEGF, GLUT-1, LDHA und PDK-1 mRNA hauptsächlich durch Sauerstoffmangel, CDKN1A und SCF mRNA vorwiegend durch Photonenbestrahlung vermehrt exprimiert wurden, änderte sich unter den gegebenen

Versuchsbedingungen die Expression von Trx-1 mRNA nicht. Anhand der gewonnenen Ergebnisse kann vermutet werden, dass es sich bei Sauerstoffmangel und Bestrahlung um additive Stimuli handelte. Insbesondere in der Reoxygenierungsgruppe hatte sich nur durch Reoxygenierung oder nur durch Bestrahlung keine wesentliche Veränderung gezeigt. Demgegenüber erbrachte der zusätzliche Reiz durch Photonenbestrahlung in der Reoxygenierungsgruppe eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression von GLUT-1, PDK-1 nach 48 h und LDHA nach 24 h. Auch Lerman et al. konnten bei der durch HIF-1 induzierten Angiogenese nach Photonenbestrahlung in Endothelzellen einen stärkeren Effekt durch zusätzliche Hypoxie feststellen (Lerman et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe stützen die Hypothese, dass es sich bei Bestrahlung und Hypoxie um additive Effekte handelt. In Übereinstimmung damit konnte hier für LDHA, PDK-1 und GLUT-1 mRNA (Abb. 40-42) ein vergleichbares Expressionsmuster gezeigt werden. Alle drei Gene wurden in ihrer Expression deutlich durch veränderten Sauerstoffgehalt reguliert. Dieser Effekt wurde aber durch zusätzliche Photonenbestrahlung insbesondere nach 48 h verstärkt, was einerseits gut vereinbar mit dem durch Moeller et al. *in vivo* festgestellten Aktivitätshöhepunkt von HIF-1 48 h nach Bestrahlung (Moeller et al., 2004) ist und andererseits für das synergistische Zusammenwirken von Hypoxie bzw. Reoxygenierung und Photonenbestrahlung spricht. Geht man davon aus, dass es sich wie oben dargelegt beim Einfluss von Photonenbestrahlung und Hypoxie auf die durch HIF-1 induzierten Angiogenese um additive Stimuli handelt (Lerman et al., 2010), ist gut vorstellbar, dass auch HIF-1-abhängige Zielgene vergleichbar beeinflusst werden. Auf mRNA-Ebene zeigte sich immerhin eine Verdopplung der untersuchten Zielgene nach Photonenbestrahlung unter Normoxie. Diese fiel jedoch gegenüber einer bis zu ca. 16-fachen Expressionssteigerung VEGFs durch Hypoxie relativ mild aus.

Schwerionenbestrahlung verursachte wie auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene bei einer biologisch äquivalenten Dosis von 2 Gy keine wesentlichen Expressionsunterschiede.

Insgesamt stellte sich in dieser Arbeit dar, dass die HIF-1-abhängigen Zielgene GLUT-1, LDHA, PDK-1 und VEGF auf mRNA-Ebene und VEGF auf Proteinebene in A549-Zellen nur nach Photonen- nicht aber nach Schwerionenbestrahlung vermehrt exprimiert wurden. Die Tatsache, dass erhöhte HIF-1-Aktivität und damit dessen Zielgene mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Lau et al., 2007; Zetter, 1998;

Zhong et al., 1999), legt einen weiteren Vorteil der Schwerionenbestrahlung gegenüber Photonenbestrahlung bezüglich der Wirksamkeit bei der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms nahe.

Unklar bleibt jedoch, warum HIF-1 und dessen Zielgene nicht auch durch Schwerionenbestrahlung vermehrt aktiviert werden. Eine Schlüsselrolle könnten freie Sauerstoffradikale übernehmen. Einerseits werden derzeit reaktive Sauerstoffspezies als Ursache für die Aktivierung von HIF-1 nach Photonenbestrahlung angesehen (Moeller et al., 2004) und andererseits ist bekannt, dass dicht ionisierende Strahlung in ihrer Wirkung weniger von der Anwesenheit von Sauerstoff und dessen Radikalen abhängig ist (K. Ando et al., 1999; M. R. Raju, 1980; Wambersie et al., 2004). Insbesondere die Anzahl einfacher Radikale sinkt mit steigendem LET (Goodhead, 1999).

Ein weiterer bekannter Aktivierungsmechanismus von HIF-1 $\alpha$  nach Photonenbestrahlung wird, neben reaktiven Sauerstoffspezies, die im Rahmen der Bestrahlung und der damit verbundenen Reoxygenierung entstehen, über AKT/mTOR vermittelt (Laughner et al., 2001). Harada et al. gehen bei der Aktivierung von HIF-1 nach Photonenbestrahlung von einer über AKT/mTOR vermittelten Signalkaskade aus, die nur unter Anwesenheit metabolisierbarer Glukose ablaufen könne (Harada et al., 2009). Demgegenüber könnte nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen diese Signalkaskade unterdrückt bzw. nicht aktiviert werden (Ogata et al., 2011). Ogata et al. vermuten, dass die Metastasierungstendenz von A549-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen verringert ist, da die Aktivierung von HIF-1 über den PI3K/Akt vermittelten Signalweg nicht aktiviert wird. Dies passt zu den Ergebnissen meiner Arbeit, dass die HIF-1 abhängigen Zielgene nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen nicht verstärkt exprimiert werden und spricht für eine PI3k/Akt vermittelte Aktivierung von HIF-1 durch Photonenbestrahlung.

Auf Genexpressionsebene konnte erstmals *in vitro* eine durch Photonenbestrahlung gesteigerte Expression HIF-1-abhängiger Zielgene in A549-Zellen gezeigt werden. Aufgrund der bestehenden Assoziation von HIF-1 mit einer schlechten Prognose (Bos et al., 2003; Lau et al., 2007; Zetter, 1998; Zhong et al., 1999) und der Hypothese, dass HIF-1 gegenüber Photonenbestrahlung nicht aber durch Schwerionenbestrahlung induziert wird, besteht darin ein weiterer Vorteil für die Schwerionenbestrahlung. Dies könnte ein wichtiges Argument zum vermehrten Einsatz von Schwerionenbestrahlung bei der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms darstellen.

## 5. Zusammenfassung

Hypoxische Tumorzellen sind besonders unsensibel für Photonenbestrahlung. Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1), dessen Rolle nach Schwerionenbestrahlung noch unklar ist, wird als eine der wesentlichen Ursachen für die Radioresistenz gegenüber der konventionellen Photonenbestrahlung angesehen. Ziel dieser Arbeit war das zelluläre Überleben und die Regulation von HIF-1 und dessen Zielgenen nach beiden Bestrahlungsqualitäten unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen an humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen (A549) zu untersuchen. Hierzu wurde mit biologisch äquivalenten Dosen das im Koloniebildungstest bestimmten 10% Überleben (D10), für Photonen [6 Gy] und Schwerionen [2 Gy] bestrahlt.

Die Ergebnisse des zellulären und klonogenen Überlebens belegten die unter Hypoxie beschriebene Resistenz gegenüber Photonenbestrahlung. Das Überleben hypoxischer gegenüber normoxischer A549-Zellen nach Schwerionenbestrahlung war jedoch nicht erhöht. Reoxygenierte Zellen zeigten kein erhöhtes Überleben nach Photonenbestrahlung. In den Genexpressionsanalysen hatte sich neben der sauerstoffabhängigen Regulation HIF-1-abhängiger Zielgene auch eine vermehrte Expression von GLUT-1, LDH-A, PDK-1 und VEGF durch Photonenbestrahlung nicht aber durch Schwerionenbestrahlung nach 48 h in normoxischen Zellen gezeigt. CDKN1A, der als Inhibitor der Zellzyklusprogression erwartungsgemäß nach Bestrahlung stark exprimiert wurde, zeigte auch eine sauerstoffabhängige Regulation. Für GLUT-1 und HIF-1 stellte sich im Western Blot und einer anschließenden Densitometrie eine signifikante Steigerung durch Hypoxie dar, nach Photonenbestrahlung ließ sich ein Trend zur Expressionssteigerung erkennen und Schwerionenbestrahlung bewirkte keine Expressionsänderung. Auf Proteinebene zeigte sich nach 72 h eine signifikante Steigerung von VEGF durch Photonenbestrahlung in normoxischen Zellen.

Die aktuell vermehrt auftretende Diskussion, dass SCF oder Trx-1 in Zusammenhang mit HIF-1 steht, ließ sich unter gegebenen Versuchsbedingungen für A549-Zellen nicht bestätigen. Während Trx-1 weder durch veränderten Sauerstoffgehalt noch durch Bestrahlung an den untersuchten Zeitpunkten in seiner Expression beeinflusst wurde, zeigte sich für SCF sowohl in der quantitativen Real Time-PCR als auch im ELISA eine vermehrte Expression nach Photonenbestrahlung, nicht jedoch nach Schwerionenbestrahlung.

Zusammenfassend lässt sich annehmen, dass HIF-1 nach Photonenbestrahlung vermehrt aktiviert wird und somit Anteil an der Radioresistenz trägt, wohingegen HIF-1 bzw. dessen Zielgene nach Schwerionenbestrahlung nicht vermehrt exprimiert werden. Darin scheint ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Photonen- und Schwerionenbestrahlung zu liegen. Aufgrund der Assoziation von HIF-1 mit einer schlechten Prognose stellt der Einsatz von Schwerionenbestrahlung einen möglichen Vorteil für Schwerionenbestrahlung bei der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms dar, was klinisch zu beweisen wäre.

## 6. Summary

Exposed to hypoxia tumor cells are notably resistant to photon irradiation. The hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) seems to play a fundamental role in this resistance, while its role after heavy-ion beam remains unknown. The intention of this study was to determine how A549-cells (non-small-cell lung carcinoma) react in different oxygenation states after irradiation with photons or heavy ions, particularly in regards to their expression of HIF-1 target genes.

Resistance of hypoxic A549 cells after photon irradiation was documented by cellular and clonogenic survival. In contrast, cellular survival after heavy-ion irradiation in hypoxic cells was not elevated to normoxic cells. Among the oxygen dependent regulation of HIF-1 target genes, gene expression analyses showed an increased expression of GLUT-1, LDH-A, PDK-1 and VEGF after photon irradiation but not after heavy-ion irradiation after 48 hours in normoxic cells. As expected, CDKN1A as inhibitor of cell cycle progression showed higher expression after both radiation forms; interestingly CDKN1A was also in an oxygen dependent manner lightly upregulated. In western blot analyses we demonstrated a significant increase of HIF-1 and GLUT-1 caused by hypoxia, but only a tendency of increased protein level in hypoxia after photon irradiation and no changes after heavy-ion irradiation. Significantly higher protein level of secreted VEGF-A could be measured 72 hours after photon irradiation in normoxic cells by ELISA analyses. Controversially discussed, I could not detect an association between HIF-1 and SCF or Trx-1 in A549-cells in this study. Whereas Trx-1-expression was neither influenced by changed oxygen partial pressure nor irradiation, I could show increased SCF mRNA by quantitative Real Time-PCR and secreted protein level by ELISA after photon irradiation independent of oxygen state.

In summary, this study showed that HIF-1 and its target genes (GLUT-1, LDHA; PDK, VEGF) and also SCF was increased after photon irradiation and therefore could take part in radioresistance of photon irradiation therapy in contrast to heavy ions. These results suggest a further benefit of the radiotherapy using heavy ions for non-small cell lung cancer.



## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
° C	Grad Celsius
μ	mikro ( $10^{-6}$ )
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
(c)DNA	(complementary) Desoxyribonukleinsäure
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CT	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	<i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum) oder <i>et alia</i>
eV	Elektronenvolt
F	forward
FCS	Fetales Kälberserum
fv.	forward
G	Erdbeschleunigung oder Gramm
GLUT-1	Glukosetransporter 1
Gy	Gray (Dosis)
H	Hypoxie
h	Stunde(n)
HCL	Wasserstoffchlorid
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hypoxia responsive element
J/kg	Joule pro Kilogramm
kb	kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
LDHA	lactate dehydrogenase A
LET	Linearer Energietransfer
M	Meter oder milli ( $10^{-3}$ )
M	molar oder Mega ( $10^6$ )
max.	maximal
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Mittelwert
N	Normoxie
n	nano ( $10^{-9}$ )
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor

OD	optische Dichte
OER	Oxygen enhancement ratio
PBGD	Porphobilinogendesaminase
PBS	phosphate buffered saline
PDK-1	Pyruvate dehydrogenase 1
PE	Plattierungseffizienz
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
R	Reoxygenierung
R	reverse
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RIPA	RadioImmuno Precipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Umdrehungen pro Minute ( revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
rv.	reverse
S	Sekunde(n)
S.	Seite
s.u.	siehe unten
SCF	Stem Cell Factor - Stammzellfaktor
SD	Standardabweichung(en) (standard deviation (s))
SF	survival fraction
SOD	Superoxid Dismutase
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx-1	Thioredoxin 1
U	Aktivitätseinheit für Enzyme (unit( s))
u. a	unter anderem

UDG	Uracil DNA-Glykosylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
VEGF(-A)	Vascular endothelial growth factor (A)
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Außerdem wurden die allgemeinen Abkürzungen des SI-Einheiten Systems verwendet.

## 7.2 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Arten des strahlenbiologischen Zelltodes .....	3
Abbildung 2: Tiefendosisprofil von Photonen und Schwerionenstrahlung.....	5
Abbildung 3: Regulation von HIF-1.....	7
Abbildung 4: Versuchsaufbau .....	18
Abbildung 5: Agarose-Gel.....	23
Abbildung 6: Lineare Regression der Primereffizienzen .....	25
Abbildung 7: Expression von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Normoxie nach unterschiedlichen Zeitpunkten.....	36
Abbildung 8: Expression von CDKN1A, GLUT-1, LDHA, PDK-1, VEGF, SCF und Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Reoxygenierung und Normoxie nach unterschiedlichen Zeitpunkten.....	37
Abbildung 9: Zelluläres Überleben der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlenqualität nach 24 h, 72 h und 7 Tagen .....	39
Abbildung 10: Klonogenes Überleben der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlenqualität.....	40
Abbildung 11: Relative Expression von CDKN1A mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	41
Abbildung 12: Expression von GLUT-1 mRNA 4, 24 und 48h nach Photonenbestrahlung .....	42
Abbildung 13: Expression von LDHA mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	42
Abbildung 15: Expression von VEGF mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	43
Abbildung 16: Expression von SCF mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung	44
Abbildung 17: Expression von Trx-1 mRNA 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	44
Abbildung 18: Relative Expression von CDKN1A mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	45
Abbildung 19: Relative Expression von GLUT-1 mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	45
Abbildung 20: Relative Expression von LDHA mRNA 24 und 48 h nach	

Schwerionenbestrahlung.....	46
Abbildung 21: Relative Expression von PDK-1 mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	46
Abbildung 22: Relative Expression von VEGF mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	46
Abbildung 23: Relative Expression von SCF mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	47
Abbildung 24: Relative Expression von Trx-1 mRNA 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	47
Abbildung 25: Expression von CDKN1A mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	49
Abbildung 26: Expression von GLUT-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	50
Abbildung 27: Expression von LDHA mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	50
Abbildung 28: Expression von PDK-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	51
Abbildung 29: Expression von VEGF mRNA in A 549 - Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4 h, 24 h und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	51
Abbildung 30: Expression von SCF mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	52
Abbildung 31: Expression von Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Photonenbestrahlung .....	52
Abbildung 32: Expression von CDKN1A mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	53
Abbildung 33: Expression von GLUT-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	53
Abbildung 34: Expression von LDHA mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	54
Abbildung 35: Expression von PDK-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	55
Abbildung 36: Expression von VEGF mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	55
Abbildung 37: Expression von SCF mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und	

Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	56
Abbildung 38: Expression von Trx-1 mRNA in A549-Zellen unter Hypoxie und Reoxygenierung 4, 24 und 48 h nach Schwerionenbestrahlung.....	56
Abbildung 39: Expressionsverhalten von CDKN1A mRNA nach Bestrahlung und geänderten Sauerstoffgehalt .....	57
Abbildung 40: Expressionsverhalten von GLUT-1 mRNA nach Bestrahlung und geänderten Sauerstoffgehalt .....	58
Abbildung 41: Expressionsverhalten von LDHA mRNA nach Bestrahlung und geänderten Sauerstoffgehalt .....	59
Abbildung 42: Expressionsverhalten von PDK-1 mRNA nach Bestrahlung und geänderten Sauerstoffgehalt .....	60
Abbildung 43: Expressionsverhalten von VEGF mRNA nach Bestrahlung und geänderten Sauerstoffgehalt .....	61
Abbildung 44: Expressionsverhalten von SCF mRNA nach Bestrahlung und geänderten Sauerstoffgehalt.....	62
Abbildung 45: Expressionsverhalten von Trx-1 mRNA nach Bestrahlung und verändertem Sauerstoffgehalt.....	63
Abbildung 46: HIF-1 $\alpha$ und GLUT-1 in Western Blot und Densitometrie bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt.....	64
Abbildung 47: HIF-1 $\alpha$ - und GLUT-1-Aktivierung in Western Blot und Densitometrie bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt.....	65
Abbildung 48 ELISA: VEGF-Expression bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung .....	66
Abbildung 49 ELISA: SCF-Expression bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt 24 h und 72 h nach Photonenbestrahlung .....	67
Abbildung 50: HIF-1-Regulation nach Photonenbestrahlung.....	69

### **7.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Geräte .....	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial und Hilfsmittel .....	12
Tabelle 3: Verwendete PC-Programme .....	13
Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Substanzen .....	15
Tabelle 5: Pufferzusammensetzungen .....	16
Tabelle 6: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel .....	16
Tabelle 7: Versuchsgruppen .....	17
Tabelle 8: Zellzahl für die Aussaat des Koloniebildungstest .....	21
Tabelle 9: Ermittelte Primereffizienzen .....	26
Tabelle 10: Verwendete Primer .....	27

### **7.4 Formelverzeichnis**

Formel 1: Linearer Energietransfer .....	5
Formel 2: Berechnung der Plattierungseffizienz .....	21
Formel 3: Berechnung der Überlebensfraktion .....	21
Formel 4: Berechnung der Primereffizienz .....	25
Formel 5: Berechnung des $\Delta C_T$ -Wertes .....	28
Formel 6: Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes .....	29
Formel 7: Berechnung des Bestrahlungseffekts .....	41
Formel 8: Berechnung des Sauerstoffeffektes in bestrahlten Zellen .....	48
Formel 9: Berechnung des Gesamteffektes .....	57



## 7.5 Literaturverzeichnis

- Akashi, M., Hachiya, M., Osawa, Y., Spirin, K., Suzuki, G., & Koeffler, H. P. (1995). Irradiation induces WAF1 expression through a p53-independent pathway in KG-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(32), 19181–19187.
- Akino, Y. U., Teshima, T. E., Kihara, A. Y., Kodera, Y. U. K. O., Suzumoto, M., Inaoka, M., Higashiyama, S Higeki Furusawa, Y. O., et al. (2009). Carbon-Ion Beam Irradiation Effectively Suppresses Migration And Invasion Of Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 75(2), 475–481.
- Anderson, C. S., & Curran, W. J. (2010). Combined modality therapy for stage III non-small-cell lung cancer. *Seminars in radiation oncology*, 20(3), 186–91.
- Ando, K., Koike, S., Ohira, C., Chen, Y. J., Nojima, K., Ando, S., Ohbuchi, T., et al. (1999). Accelerated reoxygenation of a murine fibrosarcoma after carbon-ion radiation. *International journal of radiation biology*, 75(4), 505–12.
- Ando, S., Nojima, K., Ishihara, H., Suzuki, M., Ando, M., Majima, H., Ando, K., et al. (2000). Induction by carbon-ion irradiation of the expression of vascular endothelial growth factor in lung carcinoma cells. *International journal of radiation biology*, 76(8), 1121–7.
- Arbab, A. S. (2012). Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histology and histopathology*, 27(5), 549–57.
- Aykin-Burns, N., Ahmad, I. M., Zhu, Y., Oberley, L. W., & Spitz, D. R. (2009). Increased levels of superoxide and hydrogen peroxide mediate the differential susceptibility of cancer cells vs. normal cells to glucose deprivation. *The Biochemical Journal*, 418(1), 29–37.
- Bárdos, J. I., & Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1755(2), 107–120.
- Berggren, M., Gallegos, A., Gasdaska, J. R., Gasdaska, P. Y., Warneke, J., & Powis, G. (1996). Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Research*, 16(6B), 3459–66.
- Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., et al. (2006). PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature*, 442(7104), 779–85.
- Blakely, E. A., & Kronenberg, A. (1998). Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness. *Radiation research*, 150(5 Suppl), g126–45.

- Bos, R., Van der Groep, P., Greijer, A. E., Shvarts, A., Meijer, S., Pinedo, H. M., Semenza, G. L., et al. (2003). Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*, 97(6), 1573–81.
- Brizel, D. M., Sibley, G. S., Prosnitz, L. R., Scher, R. L., & Dewhirst, M. W. (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 38(2), 285–9.
- Brown, J. M., & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer*, 4(6), 437–47.
- Brüne, B., & Zhou, J. (2003). The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Current medicinal chemistry*, 10(10), 845–55.
- Campbell, M., Freeman, J., & Freeman, J. (2007). Survival statistics. *British Journal of General Practice*, 57(538), 410.
- Cazzalini, O., Scovassi, A. I., Savio, M., Stivala, L. A., & Prosperi, E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutation research*, 704(1-3), 12–20.
- Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000). Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  during Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25130–8.
- Chapman, J., Urtasun, R., Blakely, E., Smith, K., & Tobias, C. (1978). Hypoxic cell sensitizers and heavy charged-particle radiations. *British Journal of Cancer*, 37, 184–188.
- Curtis, S. B., Tenforde, T. S., & Afzal, S. M. (1984). Hypoxic cell sensitizers and heavy charged particle beams may play complementary roles in killing hypoxic tumor cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 10(8), 1203–5.
- Demizu, Y., Sasaki, R., & Trachootham, D. (2008). Alterations of cellular redox state during NNK-induced malignant transformation and resistance to radiation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(5), 951–961.
- Dewhirst, M. W., Cao, Y., Li, C. Y., & Moeller, B. (2007). Exploring the role of HIF-1 in early angiogenesis and response to radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 83(3), 249–55.
- Dewhirst, M. W., Cao, Y., & Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature reviews. Cancer*, 8(6), 425–37.

- Dulić, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., et al. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 76(6), 1013–23.
- Ebert, B. L., Firth, J. D., & Ratcliffe, P. J. (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29083–9.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., & Yodoi, J. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *The EMBO Journal*, 18(7), 1905–1914.
- Evans, S. M., Jenkins, W. T., Shapiro, M., & Koch, C. J. (1997). Evaluation of the concept of “hypoxic fraction” as a descriptor of tumor oxygenation status. *Advances in experimental medicine and biology*, 411, 215–25.
- Fei, P., & El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5774–83.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), 453–8.
- Firth, J. D., Ebert, B. L., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6496–500.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 18(285(21)), 1182–1186.
- Fournier, C., Wiese, C., & Taucher-Scholz, G. (2004). Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. *Radiation research*, 161(6), 675–84.
- Fowler, J. F. (1989). The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *British Journal of Radiology*, 62(740), 679–694.
- Freyschmidt, J., & Schmidt, T. (2001). *Handbuch Diagnostische Radiologie: Strahlenphysik, Strahlenbiologie, Strahlenschutz* (pp. 221–225).
- Fukawa, T., Takematsu, K., Oka, K., Koike, S., Ando, K., Kobayashi, H., & Tanishita, K. (2004). Differences in pO<sub>2</sub> peaks of a murine fibrosarcoma between carbon-ion and X-ray irradiation. *Journal of radiation research*, 45(2), 303–8.
- Furusawa, Y., Fukutsu, K., Aoki, M., Itsukaichi, H., Eguchi-Kasai, K., Ohara, H., Yatagai, F., et al. (2000). Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams. *Radiation research*, 154(5), 485–96.

- Geng, L., Donnelly, E., McMahon, G., & Lin, P. (2001). Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Research*, 61(6), 2413–2419.
- Gibbs, B. F., Yasinska, I. M., Oniku, A. E., & Sumbayev, V. V. (2011). Effects of stem cell factor on hypoxia-inducible factor 1 alpha accumulation in human acute myeloid leukaemia and LAD2 mast cells. *PloS one*, 6(7), e22502.
- Gimbrone, B. Y. M. A., Leapman, S. B., & Cotran, R. S. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *The Journal of Experimental Medicine*, 136, 261–276.
- Girdhani, S., Lamont, C., Hahnfeldt, P., Abdollahi, A., & Hlatky, L. (2012). Proton Irradiation Suppresses Angiogenic Genes and Impairs Cell Invasion and Tumor Growth. *Radiation research*, 178, 33–34.
- Glocker, R., & Risse, O. (1928). Über die photochemische Wirkung von Röntgenstrahlen verschiedener Wellenlänge. *Zeitschrift für Physik*, 48, 845–851.
- Goda, N., Ryan, H., & Khadivi, B. (2003). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Molecular and cellular biology*, 23(1), 359–369.
- Goetze, K., Scholz, M., Taucher-Scholz, G., & Mueller-Klieser, W. (2007). The impact of conventional and heavy ion irradiation on tumor cell migration in vitro. *International journal of radiation biology*, 83(11-12), 889–96.
- Goodhead, D. T. (1999). Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *Journal of radiation research*, 40 Suppl, 1–13.
- Gorski, D. H., Beckett, M. A., Jaskowiak, N. T., Calvin, D. P., Mauceri, H. J., Salloum, R. M., Seetharam, S., et al. (1999). Blockade of the Vascular Endothelial Growth Factor Stress Response Increases the Antitumor Effects of Ionizing. *Cancer Research*, 3374–3378.
- Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S., & Scott, O. C. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*, 26(312), 638–48.
- Grimm, A., Dimmler, A., Stange, S., Labanaris, A., Sauer, R., Grabenbauer, G., & Horsch, R. E. (2007). Expression of HIF-1 alpha in irradiated tissue is altered by topical negative-pressure therapy. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft*, 183(3), 144–9.
- Gupta, V. K., Jaskowiak, N. T., Beckett, M. A., Mauceri, H. J., Grunstein, J., Johnson, R. S., Calvin, D. A., et al. (2002). Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance. *The Cancer Journal*, 8(1), 47–54.
- Hada, M., & Georgakilas, A. G. (2008). Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. *Journal of Radiation Research*, 49(3), 203–210.

- Hall, E. J., & Giaccia, A. (2011). *Radiobiology for the radiologist* (7. ed., p. 576). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hamada, N. (2009). Recent Insights into the Biological Action of Heavy-Ion Radiation. *Journal of Radiation Research*, 50(1), 1–9.
- Hammond, E. M., Dorie, M. J., & Giaccia, A. J. (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12207–13.
- Han, Z.-B., Ren, H., Zhao, H., Chi, Y., Chen, K., Zhou, B., Liu, Y., et al. (2008). Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). *Carcinogenesis*, 29(10), 1853–61.
- Harada, H. (2011). How Can We Overcome Tumor Hypoxia in Radiation Therapy? *Journal of Radiation Research*, 52(5), 545–556.
- Harada, H., & Hiraoka, M. (2010). Hypoxia-Inducible Factor 1 in Tumor Radioresistance. *Current Signal Transduction Therapy*, 5(3), 9.
- Harada, H., Hirota, K., Zeng, L., Zhu, Y., Gillies, W., & Ruth, J. (2012). Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nature Communications*, 3, 710–783.
- Harada, H., Itasaka, S., Kizaka-Kondoh, S., Shibuya, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., & Hiraoka, M. (2009). The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), 5332–42.
- Harada, H., Kizaka-Kondoh, S., Li, G., Itasaka, S., Shibuya, K., Inoue, M., & Hiraoka, M. (2007). Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene*, 26(54), 7508–16.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805–16.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer*, 2(1), 38–47.
- Heissig, B., Rafii, S., Akiyama, H., Ohki, Y., Sato, Y., Rafael, T., Zhu, Z., et al. (2005). Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 739–50.
- Herrmann, T., Baumann, M., & Dörr, W. (2006a). *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig* (p. 26).

- Herrmann, T., Baumann, M., & Dörr, W. (2006b). *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig* (pp. 28–31).
- Hess, C., Vuong, V., Hegyi, I., & Riesterer, O. (2001). Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222548 combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *British Journal of Cancer*, 85(12), 2010–2016.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, 264(24), 13963–13966.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim Av, et al. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468–72.
- Jakob, B., Scholz, M., & Taucher-Scholz, G. (2002). Characterization of CDKN1A (p21) binding to sites of heavy-ion-induced damage: colocalization with proteins involved in DNA repair. *International journal of radiation biology*, 78(2), 75–88.
- Jin, K., Mao, X., Sun, Y., & Xie, L. (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Clinical*, 110(3), 311–319.
- Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Hamada, N., Wada, S., Tanaka, A., Shinagawa, M., Ohtsuki, T., et al. (2010). Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 76(1), 229–41.
- Kamlah, F., Hänze, J., Arenz, A., Seay, U., Hasan, D., Juricko, J., Bischoff, B., et al. (2011). Comparison of the effects of carbon ion and photon irradiation on the angiogenic response in human lung adenocarcinoma cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 80(5), 1541–9.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*, 3(3), 177–85.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2005). Pyruvate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression in Non Small Cell Lung Cancer and Tumor-Associated Stroma. *Neoplasia*, 7(1), 1–6.
- Koutcher, J., Alfieri, A., Devitt, M., & Rhee, J. (1992). Quantitative changes in tumor metabolism, partial pressure of oxygen, and radiobiological oxygenation status postradiation. *Cancer Research*, 52, 4620–4627.
- Kraft, G. (1990). The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft*, 166(1), 10–3.

- Kraft, G. (2000). Tumorthrapy with ion beams. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 454, 1–10.
- Kuonen, F., Laurent, J., & Secondini, C. (2012). Inhibition of the Kit Ligand / c-Kit Axis Attenuates Metastasis in a Mouse Model Mimicking Local Breast Cancer Relapse after Radiotherapy after Radiotherapy.
- Laird, A., Vajkoczy, P., Shawver, L., & Thurnher, A. (2000). SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Research*, 60, 4152–4160.
- Lau, S. K., Boutros, P. C., Pintilie, M., Blackhall, F. H., Zhu, C.-Q., Strumpf, D., Johnston, M. R., et al. (2007). Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(35), 5562–9.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Patrick, C., Semenza, G. L., & Mahon, P. C. (2001). HER2 ( neu ) Signaling Increases the Rate of Synthesis : Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression HER2 ( neu ) Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 alpha ) Synthesis : Novel Mechan. *Molecular and cellular biology*, 21, 3995–4004.
- Lee, H.-C., Kim, D.-W., Jung, K.-Y., Park, I.-C., Park, M.-J., Kim, M.-S., Woo, S.-H., et al. (2004). Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *International journal of molecular medicine*, 13(6), 883–7.
- Lerman, O. Z., Greives, M. R., Singh, S. P., Thanik, V. D., Chang, C. C., Seiser, N., Brown, D. J., et al. (2010). Low-dose radiation augments vasculogenesis signaling through HIF-1-dependent and -independent SDF-1 induction. *Blood*, 116(18), 3669–3676.
- Levina, V., Marrangoni, A., Wang, T., & Loop, S. (2010). Elimination of Human Lung Cancer Stem Cells through Targeting of the Stem Cell Factor – c-kit Autocrine Signaling Loop Elimination of Human Lung Cancer Stem Cells through Targeting of the Stem Cell Factor – c-kit Autocrine. *Cancer Research*, 70(1), 338–346.
- Levy, a P., Levy, N. S., Wegner, S., & Goldberg, M. a. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13333–40.
- Li, C., Thompson, M. A., Tamayo, A. T., Zuo, Z., Vega, F., Ford, R. J., & Pham, L. V. (2012). Over-expression of Thioredoxin-1 mediates growth , survival , and chemoresistance and is a druggable target in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 1–13.
- Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., et al. (2007). Regulation of HIF-1 $\alpha$  Stability through S-nitrosylation. *Molecular cell*, 26(1), 63–74.

- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., & Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 17(1), 62–70.
- Lincoln, D. T., Ali Emadi, E. M., Tonissen, K. F., & Clarke, F. M. (2003). The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Research*, 23(3B), 2425–33.
- Litz, J., & Krystal, G. W. (2006). Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia-inducible factor-1alpha activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 5(6), 1415–22.
- Loeb, L. A., & Preston, B. D. (1986). Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annual review of genetics*, 20, 201–30.
- Lund, E., & Bastholm, L. (2000). Therapeutic synergy of TNP-470 and ionizing radiation: effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenografts. *Clinical Cancer Research*, 6, 971–978.
- Lund, E. L., Høg, A., Olsen, M. W. B., Hansen, L. T., Engelholm, S. a, & Kristjansen, P. E. G. (2004). Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 108(6), 833–838.
- Maher, F., Vannucci, S. J., & Simpson, I. a. (1993). Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT3 from the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(2), 342–5.
- Malec, V., Gottschald, O., Li, S., & Rose, F. (2010). HIF-1 $\alpha$  signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 1626–1635.
- Masunaga, S., Hirayama, R., Uzawa, A., Kashino, G., Suzuki, M., Kinashi, Y., Liu, Y., et al. (2009). The effect of post-irradiation tumor oxygenation status on recovery from radiation-induced damage in vivo: with reference to that in quiescent cell populations. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(8), 1109–16.
- McDonald, J. T., Kim, K., Norris, A. J., Vlashi, E., Phillips, T. M., Lagadec, C., Della Donna, L., et al. (2010). Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer Research*, 70(21), 8886–8895.
- Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y., & Dewhirst, M. W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, 5(5), 429–41.
- Moeller, B. J., Dreher, M. R., Rabbani, Z. N., Schroeder, T., Cao, Y., Li, C. Y., & Dewhirst, M. W. (2005). Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*, 8(2), 99–110.



- Nakamura, H., Masutani, H., Tagaya, Y., Yamauchi, A., & Inamoto, T. (1992). Expression and growth-promoting effect of adult t-cell leukemia-derived factor. A human thioredoxin homologue in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 69(8), 2091–2097.
- Nakano, T., Suzuki, Y., Ohno, T., Kato, S., Suzuki, M., Morita, S., Sato, S., et al. (2006). Carbon beam therapy overcomes the radiation resistance of uterine cervical cancer originating from hypoxia. *Clinical Cancer Research*, 12, 2185–2190.
- Ning, S., Laird, D., Cherrington, J. M., & Knox, S. J. (2002). The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiation research*, 157(1), 45–51.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), 1287–312.
- Ogata, T., Teshima, T., Inaoka, M., Minami, K., Tsuchiya, T., Isono, M., Furusawa, Y., et al. (2011). Carbon Ion Irradiation Suppresses Metastatic Potential of Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells through the Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *Journal of Radiation Research*, 52(3), 374–379.
- Ogata, T., Teshima, T., Kagawa, K., & Hishikawa, Y. (2005). Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. *Cancer Research*, 65, 113–120.
- Olive, P. L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiation research*, 150(5 Suppl), 42–51.
- Oya, N., Sasai, K., Shibata, T., Takagi, T., Shibuya, K., Koike, S., Nojima, K., et al. (2001). Time course of reoxygenation in experimental murine tumors after carbon-beam and X-ray irradiation. *Journal of radiation research*, 42(2), 131–41.
- Palcic, B., & Skarsgard, L. D. (1972). The effect of oxygen on DNA single-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 21(5), 417–33.
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism*, 3(3), 187–97.
- Pedersen, M., Löfstedt, T., Sun, J., Holmquist-Mengelbier, L., Pålman, S., & Rönnstrand, L. (2008). Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(1), 98–103.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), 45.

- Polytarchou, C., Gligoris, T., Kardamakis, D., Kotsaki, E., & Papadimitriou, E. (2004). X-rays affect the expression of genes involved in angiogenesis. *Anticancer Research*, 24(5A), 2941–2945.
- Powell, C. S., Wright, M. M., & Jackson, R. M. (2004). p38mapk and MEK1/2 inhibition contribute to cellular oxidant injury after hypoxia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(4), L826–33.
- Powis, G., Kirkpatrick, D. L., Angulo, M., & Baker, A. (1998). Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chemico-biological interactions*, 111-112, 23–34.
- Powis, G., Mustacich, D., & Coon, A. (2000). The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3-4), 312–22.
- Raffel, J., Bhattacharyya, A. K., Gallegos, A., Cui, H., Einspahr, J. G., Alberts, D. S., & Powis, G. (2003). Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 142(1), 46–51.
- Raju, M R, Amols, H. I., Bain, E., Carpenter, S. G., Cox, R. A., & Robertson, J. B. (1978). A heavy particle comparative study. Part III: OER and RBE. *The British journal of radiology*, 51(609), 712–9.
- Raju, M. R. (1980). *Heavy Particle Radiotherapy* (p. 500). New York: Academic Press Inc.
- Roots, R., & Okada, S. (1975). Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiation research*, 64(2), 306–20.
- Roots, R., & Smith, K. C. (1974). On the nature of the oxygen effect on x-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 26(5), 467–80.
- Rossi, H., & Kellerer, A. (1972). Radiation carcinogenesis at low doses. *Science*, 175.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., et al. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal*, 17(9), 2596–2606.
- Schüßler, H. (1973). Einwirkung ionisierender Strahlung auf Proteine in wäßriger Lösung. *Biophysik*, 324.
- Seegenschmiedt, M. H., & Zehe, M. (2012). Qualitätsmanagement in der Radioonkologie. *Der Onkologe*, 18(6), 485–500.
- Semenza, G L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatric research*, 49(5), 614–7.

- Semenza, G. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology*, 12(12), 5447–5454.
- Semenza, G. L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 993–8.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(10), 721–32.
- Semenza, G., Roth, P., & Fang, H. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23757–23763.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843–845.
- Siegel, R., Ward, E., & Brawley, O. (2011). Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 212–236.
- Sinclair, W. (1968). Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. 1968. *Radiation research*, 178(2).
- Smolich, B. D. (2001). The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts. *Blood*, 97(5), 1413–1421.
- Sonveaux, P., Brouet, A., Havaux, X., Gre, V., Dessy, C., & Balligand, J. (2003). Irradiation-induced Angiogenesis through the Up-Regulation of the Nitric Oxide Pathway: Implications for Tumor Radiotherapy. *Cancer Research*, 63, 1012–1019.
- Sonveaux, P., & Schroeder, T. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12).
- Sugden, M. C., & Holness, M. J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *American journal of physiology - Endocrinology and metabolism*, 284(5), E855–862.
- Sun, L., Hui, A.-M., Su, Q., Vortmeyer, A., Kotliarov, Y., Pastorino, S., Passaniti, A., et al. (2006). Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell*, 9(4), 287–300.
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sidorkina, O., & Laval, J. (2000). Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*, 39(27), 8026–31.

- Takahashi, A., Ohnishi, K., Tsuji, K., Matsumoto, H., Aoki, H., Wang, X., Tamamoto, T., et al. (2000). WAF1 accumulation by carbon-ion beam and alpha-particle irradiation in human glioblastoma cultured cells. *International journal of radiation biology*, 76(3), 335–41.
- Takahashi, S. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF Receptors and Their Inhibitors for Antiangiogenic Tumor Therapy. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(12), 1785–1788.
- Takahashi, Y., Teshima, T., Kawaguchi, N., Hamada, Y., Mori, S., Madachi, A., Ikeda, S., et al. (2003). Heavy ion irradiation inhibits in vitro angiogenesis even at sublethal dose. *Cancer Research*, 63(14), 4253–4257.
- Teicher, B. A. (1995). Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 9(2), 475–506.
- Terzoudi, G. I., & Pantelias, G. E. (1997). Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. *Mutagenesis*, 12(4), 271–6.
- Thomlinson, R., & Gray, L. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 9(4), 539–549.
- Tobias, C. A., Blakely, E. A., Alpen, E. L., Castro, J. R., Ainsworth, E. J., Curtis, S. B., Ngo, F. Q. H., et al. (1982). Molecular and cellular radiobiology of heavy ions. *International Journal of Radiation OncologyBiologyPhysics*, 8(12), 2109–2120.
- Vaupel, P., Frinak, S., & O'Hara, M. (1984). Direct measurement of reoxygenation in malignant mammary tumors after a single large dose of irradiation. *Advances in experimental medicine and biology*, 180, 773–82.
- Vaupel, P., Kallinowski, F., & Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research*, 49(23), 6449–6465.
- Wallace, S. S. (1998). Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiation research*, 150(5 Suppl), S60–79.
- Wambersie, A., Hendry, J., Gueulette, J., Gahbauer, R., Pötter, R., & Grégoire, V. (2004). Radiobiological rationale and patient selection for high-LET radiation in cancer therapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 73, S1–14.
- Wang D, Zhang YZ, Yang B, Zhang FX, Cao MY, Wang C, C. M. (2011). p21 WAF1 and hypoxia/reoxygenation-induced premature senescence of H9c2 cardiomyocytes. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 49(3), 445–451.

- Wang, G., Jiang, B., & Rue, E. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5510–4.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4304–4308.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1230–7.
- Wang, J., Kobayashi, M., Sakurada, K., Imamura, M., Moriuchi, T., & Hosokawa, M. (1997). Possible roles of an adult T-cell leukemia (ATL)-derived factor/thioredoxin in the drug resistance of ATL to adriamycin. *Blood*, 89(7), 2480–2487.
- Wangpaichitr, M., Sullivan, E. J., Theodoropoulos, G., Wu, C., You, M., Feun, L. G., Lampidis, T. J., et al. (2012). The Relationship of Thioredoxin-1 and Cisplatin Resistance: Its Impact on ROS and Oxidative Metabolism in Lung Cancer Cells. *Molecular cancer therapeutics*, 11(3), 604–15.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–14.
- Welsh, S. J., Bellamy, W. T., Briehl, M. M., & Powis, G. (2002). The Redox Protein Thioredoxin-1 ( Trx-1 ) Increases Hypoxia-inducible Factor 1  $\alpha$  Protein Expression: Trx-1 Overexpression Results in Increased Vascular Endothelial Growth Factor Production and Enhanced Tumor Angiogenesis. *Cancer Research*, 62, 5089–5095.
- Wilson, R. R. (1946). Radiological use of fast protons. *Radiology*, 47(5), 487–91.
- Woolston, C. M., Storr, S. J., Ellis, I. O., Morgan, D. A. L., & Martin, S. G. (2011). Expression of thioredoxin system and related peroxiredoxin proteins is associated with clinical outcome in radiotherapy treated early stage breast cancer. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 100(2), 308–13.
- Yamada, M., Tomida, A., & Yoshikawa, H. (1996). Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 2, 427–432.
- Yoshida, S., Ito, D., Nagumo, T., Shiota, T., Hatori, M., & Shintani, S. (2009). Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral oncology*, 45(2), 109–15.
- Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual review of medicine*, 49, 407–24.

- Zhang, M., Ma, Q., Hu, H., Zhang, D., Li, J., Ma, G., Bhat, K., et al. (2011). Stem cell factor/c-kit signaling enhances invasion of pancreatic cancer cells via HIF-1 $\alpha$  under normoxic condition. *Cancer letters*, 303(2), 108–17.
- Zhang, W., Stoica, G., Tasca, S. I., Kelly, K. A., & Meininger, C. J. (2000). Modulation of Tumor Angiogenesis by Stem Cell Factor Modulation of Tumor Angiogenesis by Stem Cell Factor 1. *Cancer Research*, 6757–6762.
- Zhang, X., Kon, T., Wang, H., Li, F., Huang, Q., Rabbani, Z. N., Kirkpatrick, J. P., et al. (2004). Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cancer Research*, 64(22), 8139–8142.
- Zhong, H., Marzo, A. M. De, Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., et al. (1999). Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  in Common Human Cancers and their Metastases. *Cancer Research*, 59, 5830–5835.
- Zhou, J., & Brüne, B. (2006). Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*, 4(3), 189–97.
- Zirkle, R. E., & Tobias, C. A. (1953). Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves. *Archives of biochemistry and biophysics*, 47(2), 282–306.
- Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., et al. (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63(1), 213–24.

## 7.6 Veröffentlichungen

- F. Kamlah, A. Arenz, **V. Bill**, B. Bischoff, R. Engenhart-Cabillic, C. Fournier, J. Hänze, C. Hornickel, F. Rose. (2010). *Role of hypoxia and HIF for the effects of heavy ion radiation in the human lung adenocarcinoma cell line (A549)*. (GSI Scientific Report).
- F. Kamlah, S. Rudolph, **V. Bill**, B. Bischoff, F. Rose, R. Engenhart-Cabillic, A. Arenz, W. Kraft-Weyrather, M. Scholz, C. Fournier, G. Taucher-Scholz, J. Hänze (2011). *Cellular survival of human lung adenocarcinoma cell line (A549) after carbon ion irradiation under different oxygenation conditions* (GSI Scientific Report).
- V. Bill**, A. Arenz, U. Seay, S. Rudolph, C. Fournier, G. Taucher-Scholz, J. Hänze, F. Rose, R. Engenhart-Cabillic, F. Kamlah (2011). *Expression HIF-1-abhängiger Gene in humanen Lungenadenokarzinom (A549)-Zellen und deren Verhalten nach Photonen- und Partikelbestrahlung*. (Abstract DEGRO, Posterpräsentation).
- F. Kamlah, **V. Bill**, S. Rudolph, N. Westholt, C. Fournier, G. Taucher-Scholz, M. Scholz, W. Kraft-Weyrather, J. Dahm-Daphi, F. Rose, R. Engenhart-Cabillic, J. Hänze (2012). *Role of Hypoxia-inducible factor-1 in human lung adenocarcinoma cells after photon- versus carbon ion irradiation* (Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung).
- F. Kamlah, **V. Bill**, S. Rudolph, N. Westholt, C. Fournier, G. Taucher-Scholz, M. Scholz, W. Kraft-Weyrather, J. Hänze, A. Arenz, F. Rose, R. Engenhart-Cabillic. (2012). *Untersuchungen zur Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktor HIF-1 $\alpha$  in humanen Lungenadenokarzinomzellen nach Photonen- versus Partikelbestrahlung*. (Abstract DEGRO, Posterpräsentation).
- F. Subtil, J. Wilhelm, **V. Bill**, N. Westholt, S. Rudolph, J. Fischer, S. Scheel, U. Seay, C. Fournier, G. Taucher-Scholz, M. Scholz, W. Seeger, R. Engenhart-Cabillic, F. Rose, J. Dahm-Daphi, and J. Hänze (2013) *Carbon ion radiotherapy of human lung cancer acts independently of HIF-1 signaling with considerably higher therapeutic efficiency than photon irradiation*. *Radiotherapy & Oncology* (accepted, FASEB Journal 2013).

## **8. Tabellarischer Lebenslauf**



## 9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Herr Prof. Dr. Acker	Herr Prof. Dr. Müller
Frau PD Dr. Ahlemeyer	Herr Prof. Dr. Münstedt
Herr Prof. Dr. Bauer	Herr Prof. Dr. Neubauer
Frau Prof. Dr. Baumgart-Vogt	Herr Prof. Dr. Niepmann
Herr Prof. Dr. Bein	Herr Prof. Dr. Nöll
Herr Dr. Bödeker	Herr Dr. Oehmke
Herr Prof. Dr. Bretzel	Herr PD Dr. Oertel
Herr Prof. Dr. Chakraborty	Herr Prof. Dr. Padberg
Herr Prof. Dr. Domann	Frau Dr. Paddenberg
Herr Prof. Dr. Dreyer	Herr Prof. Dr. Preissner
Herr Dr. Eikmann	Herr Prof. Dr. Rau
Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic	Herr Prof. Dr. Reiter
Herr Prof. Dr. Erdogan	Herr Dr. Repp
Frau Dr. Fleischer	Frau PD Dr. Reuter
Frau Prof. Dr. Füssle	Frau Prof. Dr. Roeb
Herr Prof. Dr. Gallhofer	Herr Prof. Dr. Roelcke
Herr Dr. Geyer	Herr Prof. Dr. Rummel
Herr Prof. Dr. Ghofrani	Herr Prof. Dr. Schäffer
Herr Prof. Dr. Gieler	Herr Prof. Dr. Schermuly
Frau Dr. Giffhorn-Katz	Herr Prof. Dr. Schlüter
Frau Prof. Dr. Glanz	Herr Prof. Dr. Schmitz
Herr Prof. Dr. Goebeler	Herr Prof. Dr. Schneider
Herr Prof. Dr. Grimminger	Herr Prof. Dr. Schnettler
Herr Prof. Dr. Hackstein	Herr Prof. Dr. Schranz
Herr PD Dr. Hänze	Herr Prof. Dr. Seeger
Herr Prof. Dr. Hempelmann	Herr Prof. Dr. Skrandies
Herr Prof. Dr. Kanse	Herr Prof. Dr. Snipes
Herr Prof. Dr. med. Kaps	Herr Prof. Dr. Stolz
Herr Prof. Dr. Dr. Katz	Herr Prof. Dr. Stürz
Herr Prof. Dr. Klußmann	Herr Prof. Dr. Stracke

Herr Prof. Dr. Kreuder

Herr Prof. Dr. Kummer

Herr Prof. Dr. Leichsenring

Herr Prof. Dr. Leweke

Herr Prof. Dr. Linn

Frau Prof. Dr. Lips

Herr Prof. Dr. Lochnit

Herr Prof. Dr. Lohmeyer

Frau Prof. Dr. Lorenz

Herr Prof. Dr. Meinhardt

Herr Prof. Dr. Middendorff

Herr Prof. Dr. Milch

Herr Prof. Dr. Strödter

Herr Prof. Dr. Teschemacher

Herr Prof. Dr. Tillmanns

Herr Prof. Dr. Tinneberg

Herr Dr. Dr. Valerius

Herr PD Dr. von Georgi

Herr Prof. Dr. Walmrath

Herr Prof. Dr. Weidner

Herr Prof. Dr. Weigand

Herr Prof. Dr. Weimer

Herr Prof. Dr. Weißmann

Herr Dr. Willems

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic für die Vergabe des interessanten Themas, für die umfassende Förderung, das Stipendium und die stets kompetente fachliche Betreuung. Bei Frau Dr. F. Subtil bedanke ich mich für die Bereitschaft der Betreuung dieser Arbeit. In ihr hatte ich zu jeder Zeit einen kompetenten und engagierten Ansprechpartner für alle Fragen oder Probleme.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. J. Hänze für die fachlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen.

Weiterhin danke ich allen Beteiligten der GSI Darmstadt, insbesondere Frau Dr. C. Fournier, Frau Dr. G. Taucher-Scholz, Frau Dr. W. Kraft-Weyrather und Herrn Dr. M. Scholz, die während der Strahlzeiten für einen soweit als möglich reibungslosen Versuchsablauf sorgten. Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. J. Wilhelm danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere für die Möglichkeit der Mitnutzung einiger Geräte zur Durchführung der Real Time PCR. Herrn F. Leinberger danke ich für die exzellente Zusammenarbeit bei der Durchführung der Western blot und ELISA Analysen.

Für die praktische Einarbeitung im Labor danke ich Frau Dr. F. Subtil, Frau U. Seal, Herrn D. Hasan und Frau B. Bischoff. Außerdem danke ich dem gesamten Team unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und viele fröhliche Momente im Laboralltag.

Für die moralische Unterstützung danke ich meinen lieben Freunden sowie Schwestern und deren Familien, die immer wenn es nötig war, aufmunternde Worte wussten.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich immer mit allen Kräften unterstützen, mir stets Rückhalt geben und immer für mich da sind. Danke!